

University of Groningen

Kwantitatieve bepaling van de bijnierschorschormonen en hun voornaamste metabolieten in urine.

Cost, Willem Stoffer

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1960

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Cost, W. S. (1960). *Kwantitatieve bepaling van de bijnierschorschormonen en hun voornaamste metabolieten in urine*. [, Rijksuniversiteit Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

**KWANTITATIEVE BEPALING VAN DE
BIJNIERSCHORSHORMONEN EN HUN
VOORNAAMSTE METABOLIETEN IN URINE**

W. S. COST

PROMOTOR: PROF. DR A. ARENDS

STELLINGEN

1. Indien bij een patient met symptomen van bijnierschors-hyperfunctie een sterk verhoogde excretie van 3α , 17α , 21 -trihydroxy- 5β -pregnaan- 20 -on (H_4S) wordt vastgesteld, moet de diagnose bijniercarcinoom ernstig worden overwogen.
2. SU-4885 kan worden aangewend in waardevolle functietests van het hypophyse-bijniersysteem die zeer gevoelig kunnen worden gemaakt door de excretie van individuele corticosteroiden als criterium te nemen.
3. Pasgeborenen produceren relatief meer corticosteron dan volwassenen.
4. Ratten en konijnen zijn geëngeschikte proefdieren voor het verzamelen van gegevens die moeten dienen om een beter inzicht te krijgen in de bijnierschorsfunctie van de mens.
5. Thymectomie is van twijfelachtige waarde bij de behandeling van myastenia gravis.
6. Bij kaakgewrichtsklachten, berustend op hypermobiliteit en arthrosis is discusextirpatie een symptomatische therapie welke niet meer toegepast dient te worden.
7. De mening dat eosinophilgranuloom, de ziekte van Hand-Schüller-Christian en de ziekte van Abt-Letterer-Siwe uitingen zijn van eenzelfde aandoening, is onvoldoende gefundeerd.
8. Een trauma van het slijmvlies van de conus elasticus zal slechts bij uitzondering een laryngitis subglottica tengevolge hebben.
9. Het gebruik van chemische zonulolysis met behulp van α -chymotrypsine bij de intracapsulaire cataractextractie dient slechts toegepast te worden in daarvoor geselecteerde gevallen.
10. Het werkzame bestanddeel van de momenteel door de cosmetische industrie in de handel gebrachte preparaten ter verkrijging van een bruine huidskleur geeft geen enkele bescherming tegen UV licht.
11. In artikel 87^b h van de Ongevallenwet 1921 wordt geen rekening gehouden met de ontwikkeling en toepassing van andere dan de daar genoemde benzolderivaten, waardoor dit artikel bij eventuele schadeprocedures aanleiding kan zijn tot onbillijkheden.
12. Nederlandse militairen worden onvoldoende beschermd tegen de gevaren van venerische ziekten.

RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN

KWANTITATIEVE BEPALING VAN DE BIJNIERSCHORSHORMONEN EN HUN VOORNAAMSTE METABOLIETEN IN URINE

QUANTITATIVE ESTIMATION OF ADRENAL
CORTICAL HORMONES AND THEIR PRINCIPAL
METABOLITES IN URINE

(WITH A SUMMARY IN ENGLISH)

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD
VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE GRONINGEN OP GEZAG VAN DE
RECTOR MAGNIFICUS DR PH.H. KUENEN, HOOGLE-
RAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUN-
DE, IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP WOENS-
DAG 21 DECEMBER 1960 TE 4 UUR PRECIES

DOOR

WILLEM STOFFER COST

GEBOREN TE COEVORDEN

Aan mijn ouders
Aan mijn vrouw

Dit proefschrift werd bewerkt in het Klinisch-chemisch Laboratorium (hoofd: dr. J. J. M. Vegter) van de Kliniek voor Inwendige Geneeskunde (hoofd: prof. dr. E. Mandema). Het Pathologisch-Anatomisch Laboratorium (hoofd: prof. dr. A. Arends) bood gastvrijheid voor de uitvoering van de chromatografie. Met het onderzoek werd begonnen op instigatie van prof. dr. F. S. P. van Buchem. Het chemische gedeelte kwam tot stand met steun van prof. dr. J. F. Arens; het medische gedeelte geschiedde in samenwerking met dr. H. Doorenbos.

Ervaring met chromatografische procedures werd opgedaan in de Afdeling voor Stofwisselingsziekten en Endocrinologie van het Academisch Ziekenhuis te Leiden (hoofd: prof. dr. A. Querido) en in het Analytisch Research Laboratorium van de N. V. Organon.

Materiaal voor onderzoek werd ontvangen van dr. L. Meyler, internist te Groningen; dr. A. Weeke, internist te Groningen; J. Speelman, internist te Zuidlaren; J. M. Coenegracht, internist-endocrinoloog te Maastricht; en uit de Kliniek voor Kindergeneeskunde (hoofd: prof. dr. J. H. P. Jonxis) en de Afdeling voor Stofwisselingsziekten en Endocrinologie van het Academisch Ziekenhuis te Leiden.

Referentie-steroiden werden beschikbaar gesteld door de N. V. Organon, Merck Sharp & Dohme Nederland N. V. en de British Medical Research Council. SU-4885 (Metopiron) en de indicator-kleurstoffen F_5 en F_{14} werden beschikbaar gesteld door Ciba N. V.

Reagentia en standaard-oplossingen werden bereid in de Apotheek van het Academisch Ziekenhuis (hoofd: prof. dr. T. Huijzinga).

De analyses werden verricht met belangrijke hulp van mejuffrouw J. Pol, adjunct-analyste.

Het manuscript werd verzorgd door mejuffrouw M. O. Huisman; de figuren en diagrammen werden getekend door de heer S. Pasma.

Financiële steun werd ontvangen van de Gezondheidsorganisatie T. N. O.

Aan alle personen en instanties die het onderzoek hebben mogelijk gemaakt, betuig ik mijn oprechte dank.

INHOUD.

Inleiding.	blz. 9
Hoofdstuk I. Chemie en biologie van de corticosteroiden.	17
A. Structuur van het corticosteroid-molecuul.	17
B. Enkele chemische en fysische eigenschappen van de corticosteroiden.	26
C. Biosynthese en biologische activiteit van de corticosteroiden.	21
D. De stofwisseling van de corticosteroiden.	24
E. Papierchromatografische scheiding van de corticosteroiden.	29
Hoofdstuk II. Methoden voor de kwantitatieve bepaling van corticosteroiden.	36
A. Inleiding.	36
B. Methodieken voor de kwantitatieve bepaling van corticosteroiden in urine.	37
1. Bio-assays.	37
2. Groepsbepalingen.	37
3. Bepaling van individuele corticosteroiden.	39
Hoofdstuk III. Eigen methodiek.	41
A. Schematisch overzicht.	41
B. Reagentia.	43
C. Gedetailleerde beschrijving.	44
Kwantitatieve bepaling van aldosteron.	59
Hoofdstuk IV. Resultaten.	61
A. Inleiding.	61
B. Overzicht van de kwalitatieve analyse.	62
C. Overzicht van de kwantitatieve analyse.	66
1. Recovery- proeven.	66
2. Indeling van de resultaten.	67
3. Vergelijking van de resultaten met de uitkomsten van de routine steroidbepalingen.	69
4. Interpretatie van de spectra.	72
D. Het spectrum van normale controle-personen.	74
E. Het spectrum van patienten zonder bijnierschorsafwijkingen.	81
F. Het spectrum van neonati zonder bijnierschorsafwijkingen.	86
G. Het spectrum van patienten met een hypofunctie van de bijnierschors.	89

	blz.
1. Primaire bijnierinsufficiëntie - M. Addison.	89
2. Secundaire bijnierinsufficiëntie - Panhypopituitarisme.	89
H. Het spectrum van patienten met een pathologische hyperfunctie van de bijnierschors.	95
1. Syndroom van Cushing.	95
2. Adrenogenitaal syndroom.	103
3. Syndroom van Conn.	105
I. Het spectrum van patienten met een geïnduceerde hyperfunctie van de bijnierschors.	115
1. Stimulatie met exogeen ACTH.	115
2. Stimulatie met endogeen ACTH via blokkering van de cortisolsynthese door SU-4885.	122
J. De betekenis van de F/B-ratio.	132
K. De betekenis van H_4S voor de diagnostiek van bijnierschors- en hypofyse-afwijkingen.	139
L. De fysiologische betekenis van corticosteron.	146
Samenvatting en conclusies.	149
Summary.	154
Geraadpleegde literatuur.	166

INLEIDING

Eind 1955, ongeveer een jaar na de oorspronkelijke beschrijving van primair hyperaldosteronisme door Conn, werd in de Groninger Interne Kliniek het eerste geval van dit ziektebeeld in Nederland gediagnostiseerd.

Naar aanleiding hiervan ontstond in de Kliniek de behoefte om voortaan in eigen laboratorium te kunnen beschikken over een kwantitatieve bepaling van aldosteron in de urine.

Wij hebben destijds op verzoek van prof. van Buchem getracht in deze behoefte te voorzien. Het verwerven van elementaire kennis van de steroid-chemie en het opbouwen van een bescheiden steroid-chemisch laboratorium bleken voor het welslagen van deze poging noodzakelijke voorwaarden. Toen hieraan was voldaan en de bepaling uitvoerbaar bleek, ontstond al spoedig de gedachte of het met de verkregen ervaring en de beschikbare apparatuur niet mogelijk zou zijn om behalve aldosteron nog enkele andere corticosteroiden uit de urine te isoleren.

Een onderzoek in deze richting werd sterk gestimuleerd toen grote diagnostische moeilijkheden rezen bij een patiënte met talrijke symptomen van het Conn's syndroom, zonder dat evenwel een verhoogde excretie van aldosteron kon worden vastgesteld.

Dergelijke gevallen werden ook in de literatuur beschreven en de meer algemene term "mineralocorticoid excess syndrome" verscheen, ten teken dat aldosteron volgens sommige onderzoekers niet meer die unieke plaats innam in de pathogenese van het syndroom als oorspronkelijk werd gemeend.

Aangezien de bijnierschors talrijke biologisch actieve steroiden synthetiseert, is het ontstaan van atypische ziektebeelden tengevolge van een pathologisch veranderde productie niet zo verwonderlijk.

Wanneer we het typische syndroom van Cushing en het typische syndroom van Conn toeschrijven aan geïsoleerde overproductie van respectievelijk cortisol en aldosteron, dan zullen atypische beelden van beide syndromen bijv. kunnen berusten op een gecombineerde overproductie van de betrokken hormonen.

Een andere mogelijkheid wordt duidelijk wanneer we een derde schorshormoon nl. corticosteron in deze gedachtengang betrekken.

Corticosteron neemt, wat zijn invloed op metabole processen betreft een intermediaire positie in tussen cortisol en aldosteron. Dit maakt het aannemelijk dat overproductie ervan, hetzij geïsoleerd, hetzij in combinatie met overproductie van

cortisol of van aldosteron of van beide, ziektebeelden kan doen ontstaan die zich zullen presenteren als een atypisch syndroom van Cushing of een atypisch syndroom van Conn.

Dat over een eventueel aandeel van corticosteron in het ontstaan van de bijnierschors-symptomatologie zo weinig bekend is, hangt waarschijnlijk samen met het feit dat de beschikbare chemische routinemethoden ter beoordeling van de bijnierfunctie nauwelijks in staat zijn een afspiegeling van de corticosteron-productie te geven. Zelfs in geval van een pathologische overproductie zullen corticosteron en zijn metabolieten geheel kunnen verdwijnen in de grote massa gelijktijdig bepaalde steroïden afkomstig van cortisol. Daar komt nog bij dat het ontbreken van een hydroxylgroep aan C₁₇, de steroïden afkomstig van corticosteron niet toegankelijk maakt voor de meeste chemische reacties die voor de zogenaamde groepsbepalingen worden gebruikt.

Deze groepsbepalingen, waarbij men groepen van steroïden bepaalt met gemeenschappelijke eigenschappen, zijn dus in het algemeen te weinig specifiek om het eventuele bestaan van hypercorticosteronisme te kunnen aantonen.

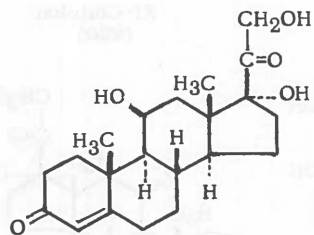
De behoefte aan meer specificiteit heeft geleid tot het ontwikkelen van methoden waarbij het mogelijk is individuele steroïden kwantitatief te bepalen.

Een voorbeeld van dergelijke methodieken is de bepaling van aldosteron in de urine volgens Neher en Wettstein, die het uitgangspunt van deze dissertatie is geweest. Men kan van deze methoden verwachten dat ze een beter inzicht zullen geven in de bijnierschorsfunctie en zo zullen leiden tot een verfijning van de diagnostiek.

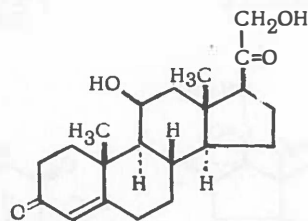
Op grond van deze overwegingen is getracht een aantal individuele steroïden kwantitatief uit de urine te isoleren waarbij zoveel mogelijk is gepoogd een aanvaardbaar compromis te vinden tussen specificiteit en nauwkeurigheid enerzijds en praktische uitvoerbaarheid en tijdsbesparing anderzijds. De voorlopige resultaten van deze poging, waarbij het werk van Burton c. s. (1951) en Richardson c. s. (1955) als uitgangspunt werd genomen, zijn in dit proefschrift neergelegd.

STRUCTUUR-FORMULES VAN IN DIT PROEFSCHRIFT VERMELDE STEROÏDEN.
CHEMICAL FORMULAE OF STEROIDS DISCUSSED IN THIS THESIS.

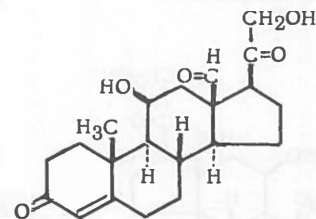
Biologisch actieve corticosteroiden
Biologically active corticosteroids



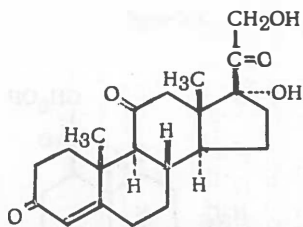
I-F



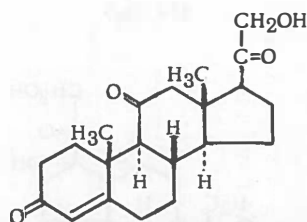
II-B



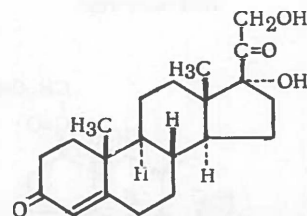
III-aldosteron



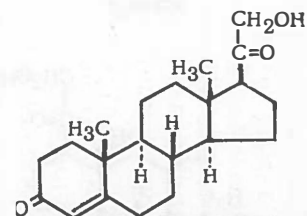
IV-E



V-A

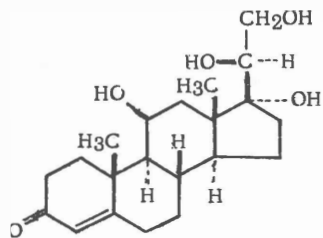


VI-S

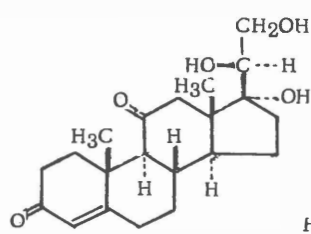


VII-DOC

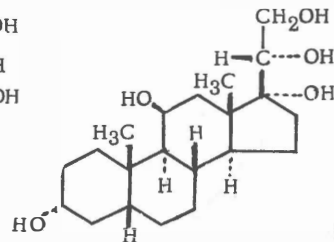
Enkele metabolieten van de biologisch actieve corticosteroiden
Some metabolites of the biologically active corticosteroids



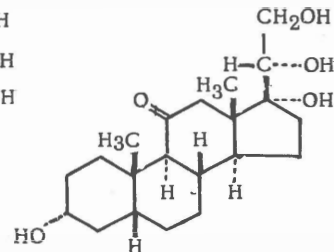
VIII-Reichstein's E
(20β)



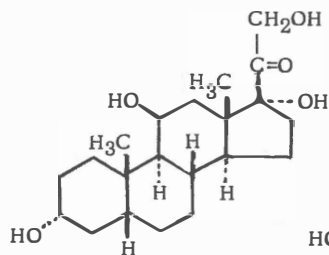
IX-Reichstein's U
(20β)



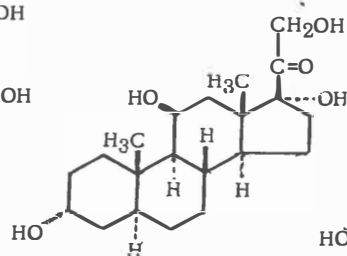
X-Cortol
(20α)



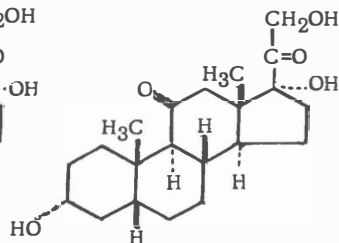
XI-Cortolon
(20α)



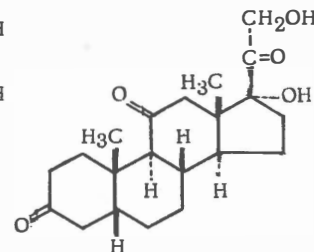
XII-H₄F



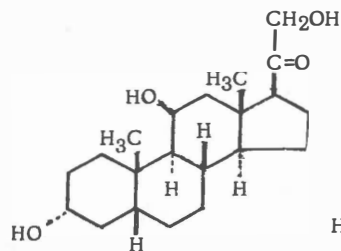
XIII-allo-H₄F



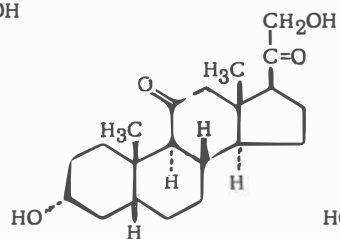
XIV-H₄E



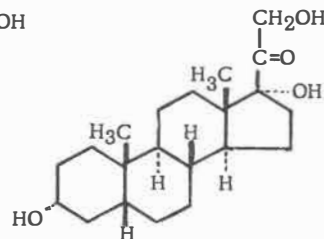
XV-H₂E



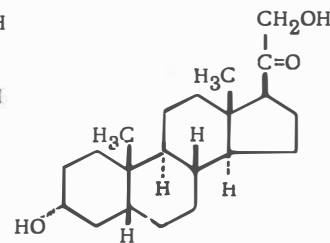
XVI-H₄B



XVII-H₄A

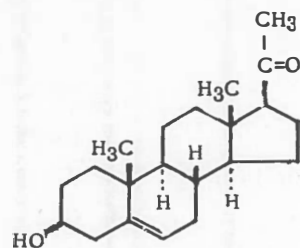


XVIII-H₄S

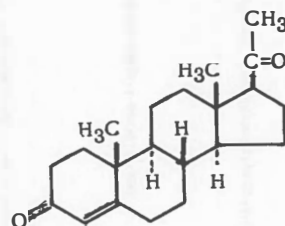


XIX-H₄DOC

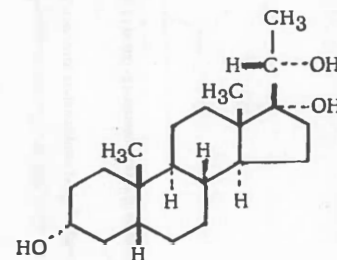
Enkele precursors van de biologisch actieve corticosteroiden
Some precursors of the biologically active corticosteroids



XX-pregnenolon

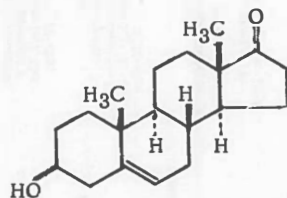


XXI-progesteron

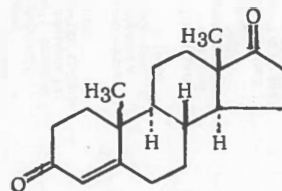


XXII-pregna antriol
(metaboliët)
(metabolite)

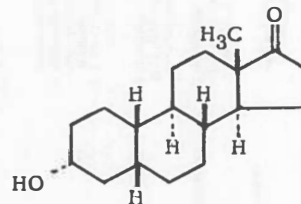
Enkele bijnierschors-androgenen
Some adrenal androgens



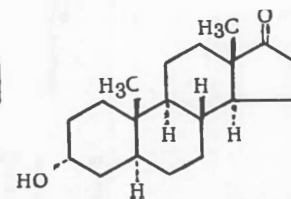
XXIII-dehydroepi-
androsteron.



XXIV-androsteendion



XXV-aetiocholanolon
(metaboliët)
(metabolite)



XXVI-androsteron
(metaboliët)
(metabolite)

TABEL I - TABLE I
NOMENCLATUUR VAN IN DIT PROEFSCHRIFT VERMELDE STEROÏDEN
NOMENCLATURE OF STEROIDS DISCUSSED IN THIS THESIS

	Systematische naam Systematic name	Synoniemen Synonyms	Gebuurte naam of letter- aanduiding Names and abbreviations, used in the thesis
I	11 β , 17 α , 21-trihydroxy-pregn-4- <i>een</i> -3, 20-dion	Cortisol Hydrocortison 17-hydroxycorticosteron Kendall's compound F Δ^4 -pregneen-11 β , 17 α , 21-triol-3, 20-dion	F
II	11 β , 21-dihydroxy-pregn-4- <i>een</i> -3, 20-dion	corticosteron Kendall's compound B Reichstein's substantie H Δ^4 -pregneen-11 β , 21-diol- 3, 20-dion	B
III	11 β , 21-dihydroxy-3, 20-dioxo-pregn-4- <i>een</i> -18-al	aldosteron electrocortine 18-formyl-11 β , 21-dihy- droxy-4-pregneen-3, 20- dion 11 β , 21-dihydroxy-3, 20- diketo-4-pregneen-18-al	aldosteron
IV	17 α , 21-dihydroxy-pregn-4- <i>een</i> -3, 11, 20-trion	cortison 17-hydroxy-11-dehydro- corticosteron Kendall's compound E Wintersteiner's compound F Reichstein's substantie Fa Δ^4 -pregneen-17 α , 21-diol- 3, 11, 20-trion	E
V	21-hydroxy-pregn-4- <i>een</i> -3, 11, 20-trion	11-dehydrocorticosteron Kendall's compound A Δ^4 -pregneen-21-ol-3, 11, 20-trion	A
VI	17 α , 21-dihydroxy-pregn-4- <i>een</i> -3, 20-dion	11-desoxy-17-hydroxycor- ticosteron 17-hydroxydesoxycortico- steron 11-desoxycortison Reichstein's substantie S Δ^4 -pregneen-17 α , 21-diol- 3, 20-dion	S
VII	21-hydroxy-pregn-4- <i>een</i> -3, 20-dion	cortexon 11-desoxycorticosteron Reichstein's substantie Q Kendall's desoxy com- pound B Δ^4 -pregneen-21-ol-3, 20- dion	DOC
VIII	11 β , 17 α , 20, 21-tetrahydroxy-pregn-4- <i>een</i> -3-on	Reichstein's substantie E Δ^4 -pregneen-11 β , 17 α , 20 β , 21-tetrol-3-on	Reichstein's E
IX	17 α , 20, 21-trihydroxy-pregn-4- <i>een</i> -3, 11-dion	Reichstein's substantie U Δ^4 -pregneen-17 α , 20 β , 21-triol-3, 11-dion	Reichstein's U
X	5 β -pregnaan-3 α , 11 β , 17 α , 20 α , 21-pentol	cortol 3 α , 11 β , 17 α , 20 α , 21- pregnaanpentol	cortol
X ^a	5 β -pregnaan-3 α , 11 β , 17 α , 20 β , 21-pentol	β -cortol	β -cortol
XI	3 α , 17 α , 20 α , 21-tetrahydroxy-5 β -pregnaan-11-on	cortolon 3 α , 17 α , 20 α , 21-pregnaan- tetrol-11-on	cortolon
XI ^a	3 α , 17 α , 20 β , 21-tetrahydroxy-5 β -pregnaan-11-on	β -cortolon	β -cortolon

	Systematische naam Systematic name	Synoniemen Synonyms	Gebruikte naam of letter- aanduiding Names and abbreviations, used in the thesis
XII	3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrahydroxy-5 β -pregnaan-20-on	tetrahydrocortisol	H ₄ F
XIII	3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrahydroxy- β α -pregnaan-20-on	allo-tetrahydrocortisol	allo-H ₄ F
XIV	3 α , 17 α , 21-trihydroxy-5 β -pregnaan-11, 20-dion	tetrahydrocortison	H ₄ E
XV	17 α , 21-dihydroxy-5 β -pregnaan-3, 11, 20-trion	dihydrocortison	H ₂ E
XVI	3 α , 11 β , 21-trihydroxy-5 β -pregnaan-20-on	tetrahydrocorticosteron	H ₄ B
XVI ^a	3 α , 11 β , 21-trihydroxy-5 α -pregnaan-20-on	allo-tetrahydrocorticosteron	allo-H ₄ B
XVII	3 α , 21-dihydroxy- β β -pregnaan-11, 20-dion	tetrahydro-11-dehydrocorticosteron	H ₄ A
XVII ^a	3 α , 21-dihydroxy- β α -pregnaan-11, 20-dion	allo-tetrahydro-11-dehydrocorticosteron	allo-H ₄ A
XVIII	3 α , 17 α , 21-trihydroxy-5 β -pregnaan-20-on	tetrahydro-17-hydroxy-desoxycorticosteron	H ₄ S
XIX	3 α , 21-dihydroxy-5 β -pregnaan-20-on	tetrahydrodesoxycorticosteron	H ₄ DOC
XX	3 β -hydroxy-pregn-5- α -een-20-on	pregnenolon Δ^5 -pregneen-3 β -ol-20-on	pregnenolon
XXI	pregn-4- α -een-3, 20-dion	progesteron Δ^4 -pregnaan-3, 20-dion	progesteron
XXI ^a	17 α -hydroxy-pregn-4- α -een-3, 20-dion	17-hydroxyprogesteron	17-hydroxyprogesteron
XXII	pregnaan-3 α , 17 α , 20 α -triol	pregnaantriol	pregnaantriol
XXII ^a	3 α , 17 α , 20 α -trihydroxy-pregnaan-11-on	pregnaantriolon	pregnaantriolon
XXIII	3 β -hydroxy-androst-5- α -een-17-on	dehydroepiandrosteron dehydroisoandrosteron	dehydroepiandrosteron
XXIV	androst-4- α -een-3, 17-dion	Δ^4 -androsteen-3, 17-dion	androsteendion
XXIV ^a	11 β -hydroxy-androst-4- α -een-3, 17-dion	Δ^4 -androsteen-11 β -ol-3, 17-dion	11 β -hydroxy-androsteendion
XXV	3 α -hydroxy-5 β -androstaan-17-on	aetiocholaan-3-ol-17-on	aetiocholanolon
XXV ^a	3 α , 11 β -dihydroxy-5 β -androstaan-17-on	11 β -hydroxy-aetiocholanolon	11 β -hydroxy-aetiocholanolon
XXV ^b	3 α -hydroxy-5 β -androstaan-11, 17-dion	11-oxo-aetiocholanolon	11-oxo-aetiocholanolon
XXVI	3 α -hydroxy-5 α -androstaan-17-on	androsteron	androsteron
XXVI ^a	3 α , 11 β -dihydroxy-5 α -androstaan-17-on	11 β -hydroxy-androsteron	11 β -hydroxy-androsteron
XXVI ^b	3 α -hydroxy-5 α -androstaan-11, 17-dion	11-oxo-androsteron	11-oxo-androsteron

HOOFDSTUK I

CHEMIE EN BIOLOGIE VAN DE CORTICOSTEROIDEN

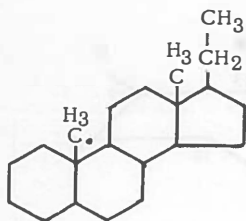
Aangezien deze studie ligt op het terrein van de steroid-chemie is het wenselijk om bij wijze van inleiding enkele aspecten te belichten van dit onderdeel van de organische scheikunde.

Indit hoofdstuk zal zeer beknopt datgene worden besproken, wat noodzakelijk lijkt voor een goed begrip van het volgende. Een uitvoeriger overzicht van de steroid-chemie, speciaal geschreven voor niet-chemici, is te vinden in een monografie van W. Klyne (1957).

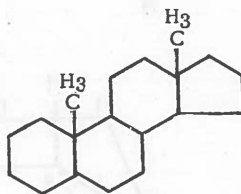
A. Structuur van het corticosteroid-molecuul.

In de bijnierschors worden drie categorieën steroiden gesynthetiseerd:

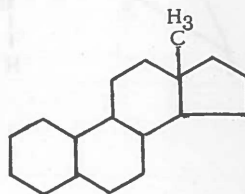
- | | |
|--------------------------|--|
| 1. corticosteroiden: | C_{21} -steroiden, afgeleid van de koolwaterstof pregnaan. |
| 2. androgene steroiden: | C_{19} -steroiden, afgeleid van de koolwaterstof androstaan. |
| 3. oestrogene steroiden: | C_{18} -steroiden, afgeleid van de koolwaterstof oestraan. |



pregnaan

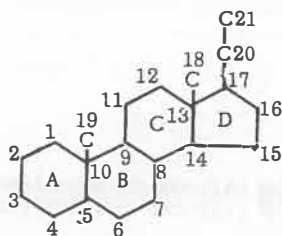


androstaan



oestraan

De ringen van de steroidkern worden aangeduid met de letters A, B, C en D; de C-atomen worden genummerd als volgt:



Door bepaalde H-atomen van de basis-structuren te vervangen door functionele groepen (bijv. hydroxyl- of carbonylgroepen) ontstaat de moleculaire structuur van de bijnierschorsproducten.

De eigenschappen van de bijniersschors-steroiden worden o. a. bepaald door aard, aantal en plaats van deze substituenten en ook door de ruimtelijke vorm van het molecuul.

In verband hiermee is het volgende van belang.

De verbinding tussen de ringen B/C en C/D is altijd een zgn. trans-verbinding; die tussen de ringen A/B kan een trans-verbinding zijn of een zgn. cis-verbinding.

Ter illustratie van deze stereoïsomerie zijn in figuur 1 de twee ruimtelijke vormen van het ringsysteem weergegeven. H-atomen of atoomgroepen die, evenals de methylgroep aan C₁₀, aan de bovenzijde van het ringsysteem liggen, worden in de naam

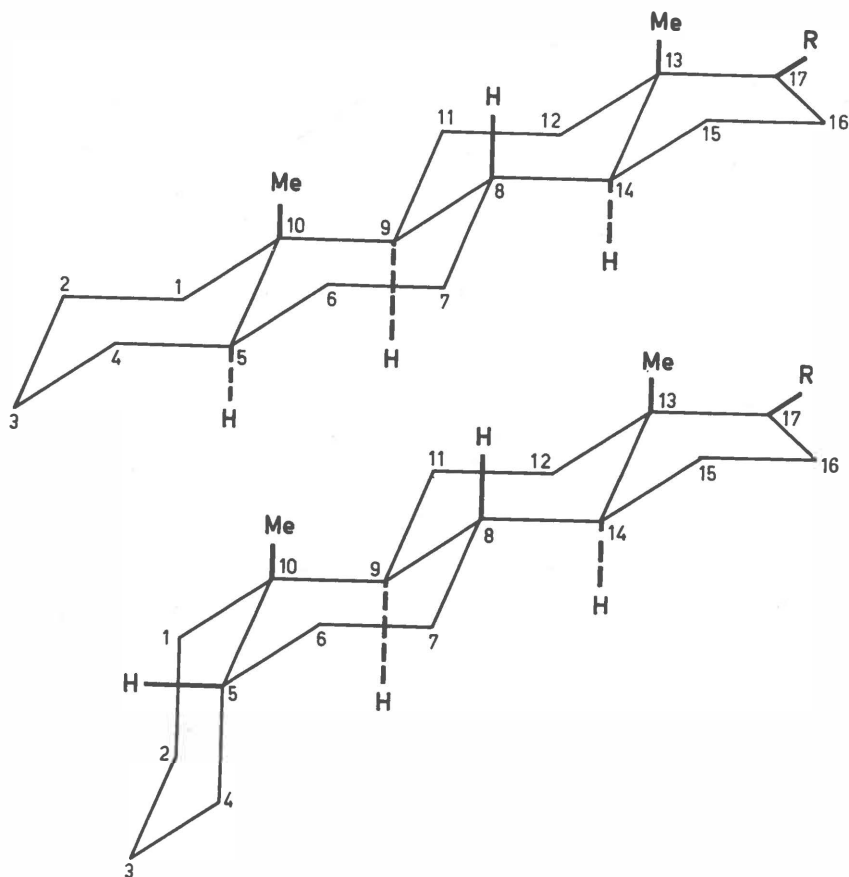


Fig. 1. 5 α (A/B-trans) - steroid (boven)
5 β (A/B-cis) - steroid (onder)

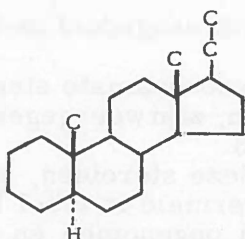
van het steroid aangegeven met de aanduiding β ; in de structuur-formule wordt de verbinding met het C-atoom door een verdikte, getrokken lijn weergegeven.

H-atomen of substituenten die onder het vlak van de tetracyclische kern liggen, worden in de naam van het steroid aangegeven met de aanduiding α ; in de structuur-formule wordt de verbinding met het C-atoom door een onderbroken lijn weergegeven.

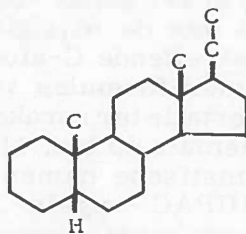
Uitgaande van de trans- resp. cis-verbinding van de ringen A en B kan men de pregnaan-derivaten verdelen in een

5α - pregnaan-serie (vroeger genoemd allo-pregnaan-serie) resp.

5β - pregnaan-serie (vroeger genoemd pregnaan-serie).



5α -pregnaan
(allo-pregnaan)



5β -pregnaan
(pregnaan)

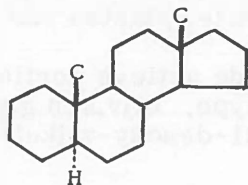
Op analoge wijze worden de androstaan-derivaten verdeeld in een

5α - androstaan-serie

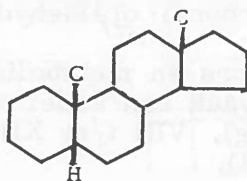
(vroeger genoemd androstaan-serie) resp.

5β - androstaan-serie

(vroeger genoemd aetiocholaan-serie).



5α -androstaan
(androstaan)



5β -androstaan
(aetiocholaan)

In de groep van de corticosteroiden is stereoisomerie nog op vele andere plaatsen (asymmetrische C-atomen) mogelijk; van praktisch belang is nog het volgende:

eventuele hydroxylgroepen aan C_{11}	zijn altijd in de 11β -positie;
" " aan C_{17}	zijn altijd in de 17α -positie;
" " aan C_{20}	zijn δ in de 20α - of in de 20β -positie (vgl. cortol en β -cortol).

Bij de naamgeving van de steroiden worden wijzigingen in de basis-structuur (pregnaan, androstaan) als volgt aangegeven:
een dubbele binding $C=C$: door het praefix Δ of het suffix -een (pregnaan \rightarrow pregneen);
een hydroxylgroep - OH: door het praefix hydroxyl- of het suffix -ol;
een carbonylgroep $C=O$: door het praefix oxo- (vroeger keto-) of het suffix -on.

De plaats van de wijziging wordt aangeduid met het nummer van het betreffende C-atoom.

De structuur-formules van de voornaamste steroiden die in deze dissertatie ter sprake komen, zijn weergegeven in de formule-schema's op blz. 11-12-13.

De systematische namen van deze steroiden, opgesteld volgens de IUPAC-regels*, zijn vermeld in tabel I. In deze tabel zijn een aantal synoniemen opgenomen en ook de namen of letters waarmee de steroiden in dit proefschrift zullen worden aangeduid.

Het molecuul van de biologisch actieve corticosteroiden (formule-schema's I t/m VII) is gekarakteriseerd door enkele belangrijke structuur-details (functionele groepen).

In alle gevallen is aanwezig:

een Δ^4 -3-oxo-groep in ring A;

een α -ketol-zijketen aan C_{17} .

Het onderlinge verschil wordt bepaald door eventuele hydroxyl-, carbonyl- of aldehyde-groepen ter plaatse van C_{11} , C_{17} , of C_{18} .

Precursors en metabolieten van de actieve corticosteroiden hebben vaak een ander zijketen-type, bijv. een glycerol-zijketen (vgl. VIII t/m XI) of een 21-desoxy-zijketen (vgl. XX t/m XXII).

B. Enkele chemische en fysische eigenschappen van de corticosteroiden.

De eigenschappen van de steroiden, waarvan gebruik is ge-

* Nomenclature of Organic Chemistry 1957, Butterworths Scientific Publications, London 1958).

maakt voor het aantonen en identificeren van deze verbindingen, zijn gebonden aan de genoemde functionele groepen:

1. steroiden met een Δ^4 -3-oxo-groep absorberen UV licht met een golflengte van omstreeks 240 m μ en geven in alkalisch milieu een gele fluorescentie in UV licht met een golflengte van omstreeks 360 m μ (natronloog-fluorescentie van Bush).
2. steroiden met een α -ketol-zijketen reduceren Blue tetrazolium tot een blauwgekleurde verbinding (BT-reactie).
3. steroiden met reactieve oxo- of aldehyde-groepen vormen met 2,4-dinitrophenylhydrazine oranje tot geel gekleurde hydrazonen (DNPH-reactie).
17-oxo-steroiden reageren met m-dinitrobenzol in alcoholische kaliloog, waarbij een niet-bestendige violette kleur ontstaat (reactie van Zimmerman).
4. steroiden met hydroxylgroepen fluoresceren met verschillende kleuren in UV licht van omstreeks 360 m μ na behandeling met 20-70% fosforzuur.

Alle reacties kunnen op papier worden uitgevoerd en verlopen, wat intensiteit betreft, evenredig met de steroidconcentratie.

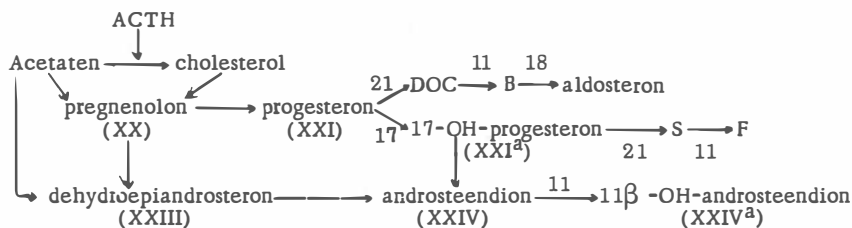
Geen enkele reactie is specifiek; het zijn zonder uitzondering reacties van bepaalde functionele groepen en niet van het volledige molecuul. Ook verbindingen die niets met steroiden uitstaande hebben, kunnen positief reageren. Grote voorzichtigheid bij de beoordeling is dus noodzakelijk.

C. Biosynthese en biologische activiteit van de corticosteroiden.

Sinds omstreeks 1930 zijn uit menselijke en dierlijke bijnier-extracten, bijniervenebloed, perifeer bloed en urine een groot aantal steroiden geïsoleerd die naar hun biologische betekenis als volgt kunnen worden verdeeld:

1. corticoïde hormonen: biologisch actieve eindproducten van de steroidsynthese in de bijnierschors die aan het bloed worden afgegeven.
2. voorstadia van de hormonen („precursors"): intermediaire producten in de hormoon-synthese.
3. metabolieten: afbraakproducten van de hormonen of de precursors.

De wijze waarop men zich de synthese van de bijnierschors-producten zou kunnen voorstellen is weergegeven in het volgende schematische overzicht (Hechter en Pincus, 1954; Dorfman, 1955; Mulrow en Cohn, 1959; Grant, 1960):



De drie gepostuleerde hydroxylases (11-, 17- en 21-hydroxylase) en het 18-oxidase zijn met de overeenkomstige nummers aangegeven.

Het is zeer wel mogelijk dat de biosynthese nog andere wegen volgt en dat de aangegeven weg niet de belangrijkste is. Hoewel het schema dus beslist geen absolute waarde heeft, kan het toehouvast bieden bij de interpretatie van waarnemingen in kliniek en laboratorium.

De biologische betekenis van de in het schema voorkomende steroiden kan als volgt worden samengevat.

F, B en aldosteron worden algemeen beschouwd als de bijnierschors-hormonen in engere zin. Omdat 11β -hydroxy-androsteendion herhaaldelijk in bijniervenebloed van patiënten zonder bijnierschorsafwijkingen is aangetoond (Pincus en Romanoff, 1955; Lombardo c.s., 1959; Short, 1960) en een geringe androgene activiteit bezit, zou men ook aan dit steroïd de status van hormoon kunnen verlenen.

De andere steroiden uit het schema kunnen worden opgevat als voorstadia van de hormonen. Vrijwel alle precursors zijn echter aangetoond in bijniervenebloed van patiënten die uiteraard de "stress" van de operatie ondergingen, maar overigens normaal functionerende bijniereën hadden.

Zo vonden Lombardo c.s., (1959) bij 12 patiënten, die wegens metastaserend carcinoom een bijnierextirpatie ondergingen, in het bijniervenebloed 12 x F, 6 x B, 5 x S, 10 x 17-hydroxy-androsteendion, 5 x 17-hydroxy-progesteron en 1 x dehydroepiandrosteron.

Short (1960) vond bij drie vrouwen met mamma-carcinoom, na toediening van ACTH, in het bijniervenebloed: F, B, 11β -hydroxy-androsteendion, androsteendion, dehydroepiandrosteron en 17-hydroxy-progesteron; bij twee van de drie patiënten werden bovendien E en progesteron aangetoond. Men moet er dus blijkbaar rekening mee houden dat ook de precursors onder bepaalde omstandigheden door de bijnier kunnen worden afgegeven aan het bloed. Misschien is het wel zo, dat de bijnierschors niet een constant aantal "hormonen" produceert maar

een steroidenmengsel waarvan de samenstelling niet alleen kwantitatief, maar ook kwalitatief voortdurend kan worden gewijzigd.

Deze kwalitatieve wijzigingen zullen hun hoogtepunt kunnen bereiken onder pathologische omstandigheden en na iatrogene beïnvloeding van de biosynthese.

De producten van de bijnierschors kunnen naar hun biologische activiteit in vier groepen worden ingedeeld:

1. Glyco- en mineralocorticoiden.

Dit zijn de zeven C_{21} -steroiden die op grond van hun vitaal belang voor de intermediaire stofwisseling reeds werden samengevat als de biologisch actieve corticosteroiden.

Van de drie hormonen bezit F een grote glycocorticoïde en geringe mineralocorticoïde activiteit en aldosteron een grote mineralocorticoïde en zeer geringe glycocorticoïde activiteit.

De F-productie per etmaal bedraagt volgens Peterson c.s. (1955) ± 25 mgr, volgens Cope en Black (1958) 4, 2 - 24 mgr (gem. 11, 3 mgr).

De aldosteron-productie per etmaal is $\pm 200 \mu g$ (Ayres c.s., 1957; Ulick c.s., 1958).

B neemt bij de mens zowel in kwantitatief als kwalitatief opzicht een plaats in tussen de twee andere hormonen.

De B-productie per etmaal bedraagt volgens Ayres c.s. (1957) ± 2 mgr, volgens Peterson en Pierce (1960) $\pm 1,5 - 4$ mgr.

S is vrijwel zeker een precursor van F en heeft mogelijk nog betekenis als hormoon met geringe mineralocorticoïde activiteit.

DOC bezit vrijwel uitsluitend mineralocorticoïde activiteit en mag worden beschouwd als een intermediair product in de synthese van B en aldosteron; het steroid is nooit in bijniervenebloed aangetoond.

E, dat grote glycocorticoïde en geringe mineralocorticoïde activiteit bezit en A, dat een matige glycocorticoïde activiteit ontplooit, zijn zeer waarschijnlijk metaboliëten van resp. F en B.

2. Progestogene steroiden.

Progesteron en zijn voornaamste derivaat 17 - hydroxyprogesteron zijn C_{21} -steroiden met een 21-desoxy-zijketen. Het zijn belangrijke intermediaire producten in de synthese van de glyco- en mineralocorticoiden. Aangezien uit recente onderzoeken is gebleken dat deze steroiden ook als zodanig aan het bloed kunnen worden afgegeven, kan men zich afvragen welke fysiologische betekenis men daaraan moet toekennen.

Het bijnier-progesteron zal dezelfde biologische activiteit kunnen ontplooiën als het corpus luteum-product; het 17-hydroxy-progesteron zou een zwakke androgene werking hebben (Kessler en Borman, 1958).

N.B. De twee groepen C_{21} -steroiden en hun C_{21} -metabolieten zullen in dit proefschrift met de verzamelnaam "Corticosteroiden" worden aangeduid.

3. Androgene steroiden.

Een aantal C_{19} -steroiden met een 17-oxo-groep bezit een androgene werking. Ze worden voor een deel als zodanig in de bijnierschors gesynthetiseerd en moeten voor een ander deel worden beschouwd als metabolieten van bepaalde C_{21} -steroiden.

In volgorde van toenemende biologische activiteit zijn de belangrijkste vertegenwoordigers van deze groep:

a. 11 β -hydroxy-androsteendion.

Dit steroid wordt door sommige onderzoekers beschouwd als het androgene bijnierschorshormoon. De dagproductie bedraagt 1-2 mgr (Bradlow en Gallagher, 1957).

b. dehydroepiandrosteron.

c. androsteron.

Door Bush c. s. (1956) is dit steroid aangetoond in bijniervenebloed in een geval van viriliserende bijnierhyperplasie.

d. androsteendion.

De betekenis van de bijnierandrogenen voor het organisme onder normale omstandigheden is nog onduidelijk. De gevolgen van een pathologische overproductie zijn vaak indrukwekkend.

4. Oestrogene steroiden.

Over de synthese van deze C_{18} -steroiden in de bijnieren is weinig bekend.

In 1938 hebben Beall en Reichstein oestron uit bijnierextract geïsoleerd; er is echter geen direct bewijs dat oestrogenen door de bijnier aan het bloed worden afgegeven.

De feminisatie, die soms optreedt bij mannen met een bijniertumor, wordt aan overproductie van deze steroiden toegeschreven (Landau c. s., 1954).

D. De stofwisseling van de corticosteroiden.

Exogene en endogene biologisch actieve corticosteroiden verdwijnen snel uit de circulatie.

De biologische halfwaarde-tijd van F is volgens Gallagher (1958), Peterson c. s. (1955) en Ayres c. s. (1957) resp. 180, 110 en 85 minuten. De biologische halfwaarde-tijd van B is volgens Peterson (1960) 80 minuten en volgens Ayres c. s. 60 minuten.

De biologische halfwaarde-tijd van aldosteron is volgens Ayres c. s. 18-25 minuten.

Deze tijden worden beïnvloed door pathologische veranderingen van de intermediaire stofwisseling en door de leeftijd. De halfwaarde-tijd van F is aanzienlijk verlengd in gevallen van myxoedeem en levercirrhose (Peterson, 1955 en 1960) en bij neonati (Migeon, 1959); een aanzienlijke verkorting werd vastgesteld bij patienten met M. Basdow.

De halfwaarde-tijd van B werd wel aanzienlijk verkort gevonden bij de Basedowpatienten, maar bleek vrijwel normaal te zijn bij de patienten met myxoedeem of levercirrhose (Peterson en Pierce, 1960).

De processen, die bijdragen tot de snelle verdwijning van de actieve steroïden uit het plasma, zijn:

1. diffusie in de extra-cellulaire ruimte en eventuele utilisatie door de weefsels (het is onbekend of de steroïden inderdaad door de cellen worden "verbruikt").
2. metabolische omzettingen, die vooral in de lever plaats vinden (Caspi en Hechter, 1956) en tot inactivering kunnen leiden.

Het corticosteroid-molecuul kan op diverse plaatsen worden aangetast en al of niet in combinatie kunnen de volgende veranderingen optreden:

- a. vervanging van de hydroxylgroep door een carbonylgroep en omgekeerd ter plaatse van C_{11} (vgl. $F \rightleftharpoons E$).
- b. reductie van de A-ring, waardoor via een dihydro-verbinding een tetrahydro-verbinding ontstaat (vgl. $E \rightarrow H_2E \rightarrow H_4E$).
- c. reductie van de α -ketol-zijketen tot een 20, 21-dihydroxy-zijketen (vgl. $F \rightarrow$ Reichstein's E) of een 21-desoxy-zijketen.
- d. vernietiging van de hele C_{17} -zijketen, waardoor een 17-oxo-steroid ontstaat (vgl. $S \rightarrow$ aetiocholanolon).

Dit proces is zeer waarschijnlijk alleen mogelijk wanneer aan C_{17} tevens een hydroxylgroep is gebonden.

De steroïdkern schijnt niet te worden afgebroken; na toediening van radioactief gemerkt F ($F - 4 - C^{14}$) werd geen radioactief CO_2 in de uitademingslucht aangetoond (Hellman c. s. 1954).

3. conjugering in de lever met glucuronzuur en, in veel mindere mate, met zwavelzuur.

Het aangrijpingspunt van de conjugering zou voornamelijk de hydroxylgroep aan C_3 zijn en in veel mindere mate de hydroxylgroep aan C_{21} .

Dit kan blijken uit het feit dat steroïden met een intacte Δ^4-3 -oxo-groep (o. a. de hormonen zelf) hoofdzakelijk in de "vrije" vorm in plasma en urine voorkomen, terwijl de te-

trahydro-metabolieten voor het overgrote deel zijn geconjugeerd.

De steroiden kunnen weer uit de conjugaten worden vrijgemaakt door hydrolyse met enzymen (glucuronidase, sulfatase) of met zuur (bijv. door de urine aan te zuren tot pH 1,0).

Steroiden, die zonder voorafgaande hydrolyse uit biologische vloeistoffen worden geëxtraheerd, vormen de zgn. "vrije fractie"; steroiden, die na intensieve hydrolysering worden geëxtraheerd, vormen de zgn. "geconjugeerde fractie".

De "vrije fractie" omvat in plasma een groter deel ($\pm 50\%$) van de totale hoeveelheid steroiden dan in urine ($\pm 4\%$). Dit kan worden verklaard door het feit, dat conjugering de oplosbaarheid van steroiden in water aanzienlijk vergroot, zodat excretie via de nieren wordt bevorderd.

Bongiovanni en Eberlein (1955) stelden in overeenstemming hiermee vast dat de renale clearance van "vrije" steroiden 11,2% en van geconjugeerde steroiden 71% van de endogene creatinine-clearance bedroeg.

Uit waarnemingen van Peterson (1955), Vermeulen (1960) e.a., dat ondanks intensieve hydrolysering met enzymen en zuur niet alle metabolieten uit de urine kunnen worden geëxtraheerd, kan blijken dat er nog andere dan de twee genoemde conjugaten in de urine voorkomen (zie punt 4).

4. excretie.

Peterson, Migeon, Hellman, Cope, Vermeulen e.a. hebben vastgesteld dat na intraveneuze toediening van F-4-C¹⁴ aan proefpersonen

$\pm 90\%$ van de toegediende radioactiviteit binnen 72 uur met de urine werd uitgescheiden ($\pm 80\%$ binnen 24 uur);

2-4% werd in de faeces aangetroffen en $\pm 4\%$ in de gal.

In analoge onderzoeken met radioactief B (Peterson en Pierce, 1960) werd iets meer radioactiviteit in de gal teruggevonden ($\pm 11\%$ van de radioactieve dosis) en iets minder in de urine ($\pm 80\%$ in 72 uur).

Van de radioactieve dosis F resp. B werd

4% in de "vrije fractie" teruggevonden (minder dan 1% onveranderd F resp. minder dan 0,5% onveranderd B) en

40-60% in de "geconjugeerde fractie" (vrijwel uitsluitend tetrahydro-verbindingen).

De resterende radioactiviteit kon niet met de gebruikelijke hydrolyse- en extractieprocedures uit de urine worden geëxtraheerd. Het is opvallend dat deze fractie bij neonati aanzienlijk groter is nl. $\pm 70\%$ (Migeon, 1959).

De physiologische betekenis van deze processen is waarschijnlijk dat het organisme op deze wijze grote schommelingen in de concentratie actieve steroïden kan voorkomen.

Een acute toename van de hormoonproductie zal kunnen worden opgevangen door de op snelle eliminering gerichte reacties: reductie van de Δ^4 -3-oxo-groep \rightarrow conjugering van de ontstane 3-hydroxygroep aan glucuronzuur \rightarrow snelle excretie via de nieren.

Een ander bufferend mechanisme dat een grote hoeveelheid plasma-F en B tegen de metabolische processen beschermt, is de binding van de hormonen aan plasma-eiwitten. Daughaday (1958) en Sandberg en Slaunwhite (1959) hebben in plasma een α -globuline aangetoond met een grote affiniteit voor steroïden met een Δ^4 -3-oxo-groep en tenminste twee hydroxylgroepen in positie 11 β , 17 α of 21.

Bij plasmaconcentraties kleiner dan 10 $\mu\text{g}\%$ zijn F en B voor bijna 100% aan dit zgn. transcortine gebonden.

Bij concentraties van 15-30 $\mu\text{g}\%$ is de geringe hoeveelheid transcortine verzadigd en bij nog hogere concentraties is van de totale hoeveelheid B en F nog slechts 70-80% gebonden.

De eiwit-gebonden hormoonfractie is praktisch gesproken biologisch inactief, maar zijn aanwezigheid maakt het mogelijk dat reeds een geringe toename van de secretie een snelle stijging in de concentratie ongebonden en dus actief materiaal kan bewerkstelligen. Deze ongebonden fractie, die in de extracellulaire ruimte en binnen de levercellen kan diffunderen, is blootgesteld aan de processen ter inactivering en eliminering.

Uit het bovenstaande blijkt dat de concentratie biologisch actieve corticosteroiden in de extracellulaire ruimte de resultante is van secretie - eiwitbinding - diffusie - desintegratie - conjugering - excretie.

Overzicht van uit de urine geïsoleerde metabolieten van biologisch actieve corticosteroiden (Lieberman c.s., 1951; Burton c.s., 1951; Schneider, 1952; Burstein c.s., 1953; Engel c.s., 1954; Dorfman, 1954; Touchstone, c.s., 1955, 1959; Richardson c.s., 1955, 1958; Rosselet c.s., 1954; Fukushima c.s., 1954, 1955, 1956; Holness c.s., 1956; Bongiovanni c.s., 1958; Southcott c.s., 1958; Gallagher, 1958; Romani, 1959; Peterson en Pierce, 1960).

1. Metabolieten van F (resp. E):

a. E (resp. F);

b. H_4E , H_4F en allo- H_4F : deze groep tetrahydro-verbindingen vertegenwoordigt ongeveer 20-40% van het gesecerneerde F.

allo- H_4E , H_2E en H_2F : slechts sporadisch aangetoond in zeer kleine hoeveelheden.

- c. 20-hydroxy-verbindingen:
cortol en β -cortol (tetrahydro-Reichstein's E);
cortolon en β -cortolon (tetrahydro-Reichstein's U);
Deze groep tetrahydro-verbindingen vertegenwoordigt ongeveer 20-30% van het gesecerneerde F.
Reichstein's E (20 α -OH en 20 β -OH) en Reichstein's U (20 α -OH en 20 β -OH) zelf zijn in veel kleinere hoeveelheden aanwezig.

- d. 21-desoxy-verbindingen;

- e. 17-oxo-steroiden:

11-oxo-aetiocholanolon en

11 β -hydroxy-aetiocholanolon vertegenwoordigen samen ongeveer 10% van het gesecerneerde F.

De stereoisomeren

11-oxo-androsteron en

11 β -hydroxy-androsteron vertegenwoordigen samen ongeveer 5% van het gesecerneerde F.

De opgegeven percentages dienen om een indruk te geven van de kwantitatieve belangrijkheid van de diverse metaboliëten en zijn ontleend aan onderzoeken met radioactief gemerkt F door Gallagher (1958).

In overeenstemming met deze gegevens is een opgave van Peterson (1960) dat de gezamenlijke tetrahydro-verbindingen 1/3 tot 1/2 van de totale F-productie omvatten.

Uit deze onderzoeken blijkt dat hoogstens 60-70% van het gesecerneerde F in de vorm van bekende metaboliëten wordt uitgescheiden.

F zelf is onder normale omstandigheden in gemakkelijk meetbare hoeveelheden in urine aanwezig.

2. Metaboliëten van B (resp. A):

- a. A (resp. B);

- b. allo-H₄B, H₄B, H₄A: deze tetrahydro-verbindingen zijn in de genoemde volgorde de belangrijkste metaboliëten van B in kwantitatief opzicht.

- c. 20-hydroxy-verbindingen;

- d. 21-desoxy-verbindingen, zoals

3 α , 11 β -dihydroxy-pregnaan-20-on
pregnaan-3 α , 11 β , 20 α -triol.

Volgens Peterson en Pierce (1960) is er geen essentieel verschil tussen het metabolisme van F en B.

Voor beide hormonen geldt dat de gezamenlijke tetrahydro-verbindingen 1/3-1/2 van de totale dagproductie omvatten, zowel onder normale omstandigheden als na stimulering van de productie met ACTH. Ook na toediening van een farmacologische dosis (100 mgr) van F resp. B trad geen verschuiving in de onderlinge verhouding van de metaboliëten op.

B zelfis onder normale omstandigheden in nauwelijks aantoonbare hoeveelheden in de urine aanwezig.

3. Metabolieten van aldosteron:
 - a. 11-dehydro-aldosteron (Nowaczynski c.s., 1957; Romani, 1959);
 - b. tetrahydro-aldosteron (Ulick, 1958).

4. Metabolieten van S:
 - a. H_4S ;
 - b. 20-hydroxy-verbindingen;
 - c. 21-desoxy-verbindingen;
 - d. 17-oxo-steroiden, vooral aetiocholanolon.

S wordt zeer snel gemetaboliseerd en is alleen onder bepaalde omstandigheden als zodanig in de urine aangetoond nl. bij ernstige levercirrhose (Johnson c.s., 1956) en een bepaalde vorm van adrenogenitaal syndroom (Eberlein en Bongiovanni, 1956).

5. Metabolieten van DOC:

De belangrijkste metaboliet is H_4DOC , dat alleen onder bepaalde omstandigheden in urine is aangetoond:

 - a. na toediening van een farmacologische dosis DOC (Richardson c.s., 1955).
 - b. na toediening van SU-4885 (Coppage c.s., 1959; Jenkins c.s. 1959).
 - c. bij een bepaalde vorm van adrenogenitaal syndroom (Eberlein en Bongiovanni, 1956).
 - d. in een geval van primair hyperaldosteronisme met oedeemvorming (Romani, 1959).

DOC als zodanig is nooit met zekerheid in urine aangetoond.

6. Metabolieten van progesteron:
 - a. pregnaan- 3α , 20α -diol;
 - b. in gevallen van viriliserende bijnierhyperplasie worden grote hoeveelheden C_{21} -desoxy-steroiden uitgescheiden die bij normale personen en bij patienten met bijnieradenomen in veel geringere hoeveelheden in de urine aanwezig zijn (Cox en Finkelstein, 1957; Fukushima en Gallagher, 1957; Bongiovanni c.s., 1959; Cox, 1960). De voornaamste zijn pregnaantriol en pregnaantriolon, beide te beschouwen als metabolieten van 17-hydroxyprogesteron.

E. Papierchromatografische scheiding van de corticosteroiden.

Papierchromatografie is een der beste methoden voor de scheiding van steroid-mengsels; bovendien levert het papierchromatografisch gedrag van een steroid belangrijke gegevens over de aard van het steroid. De methode heeft zich dan ook in

korte tijd ontwikkeld tot een onmisbaar hulpmiddel in de steroid-chemie.

Voor een uitvoerige bespreking van de methode wordt verwezen naar een monografie van R. Neher (1958^a), waarin de gegevens uit bijna 400 oorspronkelijke publicaties zijn samengevat.

1. Chromatografische systemen.

Voor de scheiding van steroiden op papier zijn door Zaffaroni en Bush in resp. 1950 en 1952 geschikte systemen samengesteld. De systemen van het Zaffaroni-type en het Bush-type zijn principieel verschillend en hebben beide voor- en nadelen.

De Zaffaroni-systemen zijn meestal watervrij; als stationnaire fase worden polaire oplosmiddelen gebruikt, bijv. propyleenglycol of formamide - als mobiele fase dienen onpolaire oplosmiddelen, bijv. chloroform of tolueen.* De stationnaire fase wordt in het papier gebracht door impregnering.

Enkele voordelen van dit type zijn: grote beladingscapaciteit en geringere gevoeligheid voor temperatuurschommelingen. Een nadeel is dat de chromatogrammen na de ontwikkeling slechts langzaam drogen omdat de stationnaire fase weinig vluchtig is.

Bij de Bush-systemen is de stationnaire fase een mengsel van polaire vloeistoffen methanol en water in verschillende mengverhoudingen. Het chromatogram wordt eerst beladen met het te scheiden mengsel en daarna in de chromatografietank met methanol- en waterdamp verzadigd. Een vrij langdurige aequilibratietijd is hiervoor nodig. Als mobiele fase dienen onpolaire oplosmiddelen, bijv. benzeen, tolueen, petroleum-aether, aethylacetaat etc. in diverse mengverhoudingen.

Een voordeel is de korte droogtijd; nadelen zijn de geringe beladingscapaciteit en grotere temperatuurgevoeligheid. Altijd moeten de twee fasen van ieder systeem voor het gebruik door intensief schudden met elkaar verzadigd worden. De oplosmiddelen moeten een hoge graad van zuiverheid bezitten.

2. Rf-waarde.

In een bepaald chromatografisch systeem is de verhouding tussen de afstand, afgelegd door een bepaald steroid en de afstand, tegelijkertijd afgelegd door het vloeistoffront, altijd dezelfde.

Deze constante: $\frac{\text{afstand startlijn} - \text{middenpunt van de vlek}}{\text{afstand startlijn} - \text{vloeistoffront}}$ is de Rf-waarde van dit steroid in dit systeem.

In een bepaald systeem hebben verschillende steroiden over

* De woorden "polair" en "onpolair" hebben voor de praktijk van de chromatografie ongeveer dezelfde betekenis als hydrophil resp. hydrophob of lipophil.

het algemeen verschillende Rf-waarden; in verschillende systemen heeft een bepaald steroid over het algemeen verschillende Rf-waarden.

De Rf-waarde is een belangrijk fysisch karakteristiekum van een steroid; zij wordt bepaald door de moleculaire structuur en wel speciaal door het aantal carbonyl- en hydroxylgroepen en door de graad van verzadiging van de steroidkern.

Wanneer men van een steroid de structuurformule kent, kan men de Rf-waarde bij benadering vaststellen en omgekeerd, wanneer men de Rf-waarde van een onbekend steroid in diverse systemen kent, kan men hieruit belangrijke conclusies trekken betreffende de identiteit. Als men voldoende referentie-steroiden bezit, kan het zelfs mogelijk zijn om de identiteit van een onbekend steroid met aan zekerheid grenzende waarschijnlijkheid vast te stellen. Men moet daartoe in een aantal uiteenlopende systemen de Rf-waarde van de onbekende vergelijken met de Rf-waarden van de referentie-steroiden die op hetzelfde chromatogram meelopen.

De onbekende kan nooit identiek zijn met referentie-steroiden die een andere Rf-waarde hebben. Als de onbekende in één systeem dezelfde Rf-waarde heeft als een referentie-steroid is identiteit mogelijk maar toeval zeker niet uitgesloten. De toevalsfactor wordt aanzienlijk kleiner als de Rf-waarden in twee systemen gelijk zijn en is vrijwel verdwenen als dit in drie of meer systemen het geval is, vooral wanneer de twee vergeleken steroiden bovendien nog dezelfde chemische eigenschappen hebben.

3. Relatieve Rf-waarde.

Om een goede scheiding te krijgen, is het vaak nodig het chromatogram zo langdurig te ontwikkelen dat het vloeistoffront het papier ondertussen heeft verlaten. Berekening van de absolute Rf-waarde is dan niet meer mogelijk en daarom heeft men het begrip relatieve Rf-waarde ingevoerd.

De afstand, afgelegd door een bepaald steroid wordt nu betrokken op de afstand, afgelegd door nog op het papier aanwezige referentie-steroiden.

De Rf_A van een steroid X: $\frac{\text{de afstand afgelegd door X}}{\text{de afstand afgelegd door A}}$ is voor een bepaald systeem constant en is van evenveel belang als de absolute Rf-waarde.

4. Polariteit.

De bruikbaarheid van een chromatografisch systeem voor de scheiding van corticosteroiden wordt bepaald door de polariteit zowel van de te scheiden steroiden als van de systemen.

De polariteit van een steroid is afhankelijk van het aantal functionele groepen (carbonyl- en hydroxylgroepen, dubbele bin-

dingen in de kern etc.). Hoe meer dergelijke functionele groepen, hoe groter de polariteit en hoe kleiner de Rf-waarde in de besproken systemen.

De polariteit van een systeem wordt bepaald door het verschil in polariteit van de twee fasen.

De polariteit van de Zaffaroni- en Bush-systemen wordt groter naarmate een sterker hydrofiel oplosmiddel als stationnaire fase wordt gebruikt en een sterker lipofiel oplosmiddel als mobiele fase.

In polaire systemen hebben hoogpolaire steroiden een Rf-waarde die groot genoeg is voor een goede scheiding in korte tijd. De weinig polaire steroiden hebben in een dergelijk systeem zo'n grote Rf-waarde, dat ze als één massa met het vloeistoffront meelopen en dus niet kunnen worden gescheiden.

In systemen met een geringe polariteit hebben de laagpolaire steroiden een Rf-waarde die klein genoeg is voor een goede scheiding; de hoogpolaire steroiden hebben in een dergelijk systeem zo'n kleine Rf-waarde, dat ze zich slechts heel langzaam verplaatsen. Toch zijn ook deze steroiden in een systeem met geringe polariteit nog wel te scheiden, als men de ontwikkeling maar lang genoeg voortzet; terwijl de laagpolaire steroiden de een na de ander van het papier aflopen, is het mogelijk om na dagenlange ontwikkeling de polaire steroiden gescheiden over het papier verdeeld te krijgen.

Voor de scheiding van polaire steroiden zijn dus alle systemen min of meer geschikt, al gaat het soms ten koste van veel tijd.

Veel gebruikte systemen, gerangschikt volgens stijgende polariteit, zijn:

Bush A: heptaan/methanol:water 5 : 4 : 1.

Propyleenglycol/tolueen.

Bush B₁: petroleumaether:tolueen/methanol:water 5 : 5 : 7 : 3.

Formamide/benzeen.

Formamide/chloroform.

Bush C: tolueen:aethylacetaat/methanol:water 9 : 1 : 5 : 5.

De corticosteroiden kunnen worden gerangschikt en gegroepeerd volgens stijgende polariteit in de volgende reeks:

a. laagpolair: DOC en A;

b. gemiddeld polair: B, H₄A, allo-H₄B, H₄B;

c. hoogpolair: E, F, H₄E, allo-H₄F, H₄F, cortolon, cortol.

Ben zijn metaboliëten zijn minder polair dan F en zijn metaboliëten dank zij het ontbreken van de hydroxylgroep aan C₁₇.

Het verschil in polariteit tussen de twee uitersten DOC (één hydroxylgroep) en cortol (vijf hydroxylgroepen) is zo enorm groot dat het onmogelijk is met één chromatografische procedure de hele reeks corticosteroiden individueel uit een mengsel of extract te isoleren. Men kan met één chromatografie

hoogstens een voorscheiding in groepen tot stand brengen; door toepassing van een tweede of zelfs derde chromatografie, telkens met behulp van speciaal gekozen systemen, kunnen de groepen dan weer stuk voor stuk opgesplitst worden in individuen.

5. Localisatie en identificatie van steroiden op het chromatogram.

Steroiden zijn ongekleurde verbindingen, zodat de ontwikkelde engedroogde chromatogrammen aan speciale procedures moeten worden onderworpen om de plaats en de identiteit van de aanwezige steroiden te kunnen vaststellen. Wij hebben daarvoor gebruik gemaakt van de fysische en chemische eigenschappen die in paragraaf B zijn genoemd:

a. Absorptie van UV licht.

Op een fotografische afdruk van het chromatogram, gemaakt met UV licht van ongeveer $240\text{ m}\mu$, zijn de Δ^4 -3-oxo-steroiden als witte vlekken zichtbaar tot een minimum van ongeveer $1\text{ }\mu\text{g}$ steroid per cm^2 papier.

b. Kleurreacties.

De chromatogrammen worden geïmpregneerd met de diverse reagentia waardoor de reagerende steroiden als gekleurde vlekken zichtbaar worden.

1) BT-reactie.

De α -ketol-steroiden worden zichtbaar tot een minimum van $0,2\text{ }\mu\text{g}$ steroid per cm^2 papier.

Steroiden met een Δ^4 -3-oxo-groep of een 20, 21-dihydroxy-zijketen geven soms ook zwakke reacties.

2) DNPH-reactie.

3) Zimmermann-reactie.

c. Fluorescentie in UV licht.

De chromatogrammen worden met loog of zuur geïmpregneerd, bij ongeveer 90°C op een glasplaat gedroogd en dan bekeken in UV licht met een golflengte van ongeveer $360\text{ m}\mu$.

1) natronloog-fluorescentie van Bush.

De reactie is vrij specifiek en zeer gevoelig: $0,1\text{ }\mu\text{g}$ steroid per cm^2 papier kan nog worden aangetoond.

2) fosforzuur-fluorescentie.

Zeer informatief is de combinatie BT-reactie + natronloog-fluorescentie.

Deze reacties kunnen nl. na elkaar op hetzelfde chromatogram worden uitgevoerd: na impregnering met het alkalische BT-reagens en aftekening van de BT-positieve vlekken wordt het papier gedroogd en onder de UV-lamp bekeken.

De actieve corticosteroiden (Δ^4 -3-oxo-groep + α -ketol-zijketen) zijn zowel Fl-positief als BT-positief. De voornaamste tetrahydro-metabolieten zijn alleen BT-positief.

Deze unieke combinatie heeft nog het voordeel dat men soms gewaarschuwd wordt voor de aanwezigheid van meer dan een steroid op dezelfde plaats van het chromatogram: discrepantie tussen kleur-oppervlak en -intensiteit van de BT-vlek enerzijds en de fluorescentie-vlek anderzijds wijst in die richting.

Afgezien van deze ene combinatie-mogelijkheid kan men slechts één kleur- of fluorescentie-reactie op een steroid in papier toepassen. Bij de reacties wordt het molecuul nl. chemisch veranderd en daardoor ontoegankelijk voor een volgende procedure.

Wil men een steroid voor identificatie-doeleinden aan meer dan een reactie op papier onderwerpen, dan is dit slechts mogelijk door de chromatogramstrook overlangs in repen te knippen en op iedere reep een andere reactie toe te passen.

Wanneer het de bedoeling is een steroid of steroid-mengsel te elueren, d. w. z. weer uit het papier in oplossing te brengen, bijv. voor rechromatografie in een ander systeem of voor kwantitatieve bepaling in een spectrofotometer, moet men voor het bepalen van zijn plaats een procedure kiezen die het steroid-molecuul intact laat. Voor de Δ^4 -3-oxo-steroiden is de UV-absorptie in dit opzicht zeer geschikt. Voor andere steroiden zal men zijn toevlucht moeten nemen tot parallelstroken, waarop men referentie-steroiden of een identiek extract laat meelopen. De plaats van de steroiden op de te elueren strook wordt dan bepaald op grond van de bevindingen op de parallelstroken die aan bovengenoemde reacties worden onderworpen.

6. Kwantitatieve bepaling van geïsoleerde steroiden op het chromatogram.

De intensiteit van de kleur en de fluorescentie, opgewekt door de besproken reacties, is evenredig met de in het papier aanwezige hoeveelheid reagerend materiaal.

Hierdoor is het mogelijk om onmiddellijk in aansluiting aan de identificatie een kwantitatieve bepaling op papier uit te voeren. Het principe is als volgt: men chromatografeert de onbekende hoeveelheid steroid x naast nauwkeurig gedoseerde hoeveelheden standaard-x. Na behandeling van het ontwikkelde chromatogram op een der besproken manieren worden de vlekken, naar grootte en kleurintensiteit, visueel vergeleken. Na enige oefening is op deze wijze een schatting mogelijk binnen een foutenmarge van + 15% tot - 15%. De beste resultaten worden naar onze ervaring verkregen als de te schatten hoeveelheden tussen 1 en 5 μg liggen en men een verdunningsreeks van de onbekende vergelijkt met drie standaardhoeveelheden, nl. 1 $\frac{1}{4}$ μg - 2 $\frac{1}{2}$ μg - 5 μg . Het volgende voorbeeld illustreert deze werkwijze.

Van een extract, waarin men de aanwezigheid van $\pm 20 \mu\text{g}$ F

vermoedt, maakt men de verdunningen $1/4 - 1/8 - 1/16$. Een chromatogram, bestaande uit zes parallelstroken, wordt dan beladen met resp. $1\frac{1}{4} \mu\text{g}$ standaard-F; $1/16$ extract ($= \pm 1\frac{1}{4} \mu\text{g}$ F); $2\frac{1}{2} \mu\text{g}$ standaard; $1/8$ extract ($= \pm 2\frac{1}{2} \mu\text{g}$); $5 \mu\text{g}$ standaard; $1/16$ extract ($= \pm 5 \mu\text{g}$).

Een schattingsfout van $\pm 15\%$ is groot: men is geneigd van een semi-kwantitatieve bepaling te spreken en de voorkeur te geven aan een spectrofotometrische bepaling. Er zijn twee redenen waarom wij deze methode toch hebben toegepast:

- a. de bepaling op papier bespaart veel tijd. Het vaststellen van de kwantiteit geschiedt hierbij als het ware en passant met procedures die toch in ieder geval moeten worden uitgevoerd voor isolering en identificatie.
Een spectrofotometrische bepaling daarentegen vereist als extra werk een intensieve voor-zuivering van het chromatografisch papier, een eluering, een chemische reactie en een meting.
- b. de kwantitatieve bepaling van individuele corticosteroiden uit urine-extracten omvat zoveel bewerkingen, die stuk voor stuk met verlies gepaard gaan, dat het gemotiveerd lijkt om in de slotfase af te zien van zeer nauwkeurige instrumentale metingen.

HOOFDSTUK II

METHODEN VOOR DE KWANTITATIEVE BEPALING VAN CORTICOSTEROIDEN

A. Inleiding.

Kwalitatieve en kwantitatieve bepalingen van steroïden in bloed en urine kunnen in belangrijke mate bijdragen tot de diagnostiek van abnormale bijnierschorsfunctie.

In de laatste twee decennia zijn dan ook talrijke methodieken voor dit doel ontworpen.

Deze methodieken waren aanvankelijk gebaseerd op de fysiologische eigenschappen van de actieve corticosteroïden (bioassays), later op chemische en fysische eigenschappen van de steroïden in het algemeen.

Van zeer recente datum zijn isotoop-verdunningsmethoden met behulp van radioactieve steroïden. Deze zullen, dank zij hun hoge graad van nauwkeurigheid en specificiteit, de andere methoden in de toekomst wel verdringen.

Gezien de geringe concentratie van de steroïden in biologische vloeistoffen is het in alle gevallen noodzakelijk dat de steroïden worden geconcentreerd in een extract. Aanvankelijk werden ruwe extracten voor de bepaling gebruikt, later werd vooraf een meer of minder intensieve zuiveringsprocedure toegepast in een poging zoveel mogelijk α -specifiek reagerend materiaal te verwijderen. De methoden werden daardoor specifiek maar ook ingewikkelder.

Het is nog altijd een punt van discussie of men moet uitgaan van bloed of urine. Via steroïdbepalingen in bloed wordt de hormoonsecretie directer benaderd dan via bepalingen in urine, waarbij men immers de *secretie* afleidt uit de *excretie*.

Deze afleiding is over het algemeen wel geoorloofd, mits men er rekening mee houdt dat zelfs bij normale nierfunctie de grootte van de diurese invloed kan hebben op de hoeveelheid uitgescheiden steroïden. In geval van een pathologische nierfunctie moet men bij de beoordeling uiteraard nog voorzichtiger zijn.

Bepalingen in de 24 uren urine geven een beter inzicht in de totale dagproductie van de bijnier. Een bloedbepaling daarentegen is een momentopname; bij de beoordeling ervan moet men o. a. rekening houden met het dagritme in de bijnierschorsactiviteit en met de "stress" van de venapunctie.

Enkele praktische voordelen van het werken met urine zijn:

1. urine is gemakkelijk en zonder bezwaar voor de patient te verzamelen in zodanige hoeveelheden, dat men voor de bepaling de beschikking heeft over relatief grote hoeveelheden steroiden.

De bepalingmethoden kunnen daarom iets minder gevoelig zijn en dus minder kwetsbaar.

2. urine is door de afwezigheid van eiwitten gemakkelijker te bewerken.

Beide methoden hebben dus voor- en nadelen zonder dat een ervan duidelijk superieur is. In het begin concentreerde men zich op het urine-onderzoek, later werd aan bloedbepalingen de voorkeur gegeven; tegenwoordig plaatst men de methoden niet meer tegenover maar naast elkaar, zodat de een de ander kan aanvullen. Het is wel zeker dat zowel in bloed als urine de bepaling van alleen de actieve corticosteroiden, met verwaarlozing van de metaboliëten, minder volledige inlichtingen verschaft dan de bepaling van zoveel mogelijk steroiden. Aangezien bepalingen in bloed en ook bepalingen met behulp van radioactieve steroiden buiten het kader van deze studie vallen, zullen in dit hoofdstuk alleen enkele categorieën urinebepalingen kort worden besproken.

B. Methodieken voor de kwantitatieve bepaling van corticosteroiden in de urine.

1. Bio-assays.

Bij de bio-assay wordt het urine-extract onderzocht op de aanwezigheid van biologisch actief materiaal. Het effect van bij proefdieren ingespoten extract wordt kwantitatief vergeleken met het effect van een standaard in diverse doseringen.

Glycocorticoiden kunnen op deze wijze bijv. worden aangetoond dank zij hun invloed in positieve zin op het glycogeengehalte van de lever (Venning, 1946), of hun invloed in negatieve zin op de circulerende eosinophile leucocyten (Speirs en Meyer, 1949).

Mineralocorticoiden kunnen worden aangetoond dank zij hun negatieve invloed op de Na/K-verhouding in de urine (Simpson en Tait, 1952).

Bio-assays zijn kostbaar en tijdrovend en daardoor niet geschikt voor routinegebruik in een Klinisch Laboratorium.

2. Groepsbepalingen.

Van de methodieken, die berusten op chemische en fysische eigenschappen van de steroiden, zijn de zgn. groepsbepalingen de oudste.

Hierbij worden steroiden, die een functioneel structuurdetail gemeen hebben, als groep bepaald. Met dit gemeenschappelijke

detail - vrijwel altijd de zijketen aan C_{17} - als aangrijpingspunt, wordt een reactie uitgevoerd die resulteert in een spectrofotometrisch te bepalen product.

De aanwezigheid van α -specifiek reagerend materiaal in extracten is eerder regel dan uitzondering, zodat correcties noodzakelijk zijn.

Zonder dat op details wordt ingegaan, volgt hieronder een overzicht van de principes waarop de meest gebruikte methoden berusten, met opgave van het reagerend molecuuldeel:

a. reductie van:

- 1) koperzouten (Talbot c. s., 1945): α -ketol-zijketen.
 - 2) phosphomolybdeenzuur (Heard c. s., 1946): α -ketol-zijketen; Δ^4 -3-oxo-groep.
 - 3) blue tetrazolium (Chen c. s., 1953): α -ketol-zijketen.
- Op deze wijze bepaalde steroiden worden in de literatuur samengevat als *reducerende steroiden*.

b. reactie met phenylhydrazine in zwavelzuur.

(Reddy c. s., 1952 en 1954): 17, 21-dihydroxy-20-oxo-groep. Samengevat als *Porter-Silber chromogenen*.

c. afsplitsing van acetaldehyde met perijoodzuur en kwantitatieve bepaling van het afgesplitste aldehyde.

(Cox, 1952): 21-desoxy-17, 20-dihydroxy-groep. Samengevat als *acetaldehydogene steroiden*.

d. afsplitsing van formaldehyde met perijoodzuur en kwantitatieve bepaling van het afgesplitste formaldehyde.

(Corcoran en Page, 1948; Daugheday c. s., 1948):

α -ketol- en 20, 21-dihydroxy-groep, al of niet met nog een hydroxylgroep aan C_{17} .

Samengevat als *formaldehydogene steroiden*.

e. oxydatie van de C_{21} -steroiden met een C_{17} -hydroxylgroep tot 17-oxo-steroiden met behulp van Na-bismuthaat.

Vóór en na de oxydatie worden de 17-oxo-steroiden met het Zimmerman's reagens bepaald. Na aftrek van de 17-oxo-steroiden, die als zodanig in de urine voorkomen, is het gehalte aan *17-ketogene steroiden* bekend (Norymberski, 1952 en 1953):

17, 21-dihydroxy-20-oxo-groep;

17, 20, 21-trihydroxy-groep;

21-desoxy-17, 20-dihydroxy-groep.

Steroiden met een 21-desoxy-20-oxo-17-hydroxy-groep worden niet door Na-bismuthaat geoxydeerd en dus niet mee bepaald. Wanneer men deze steroiden eerst met Na-borohydride reduceert tot 21-desoxy-17, 20-dihydroxy-steroiden en pas daarna de oxydatie uitvoert, bepaalt men op de beschreven wijze het gehalte aan *totale 17-hydroxy-steroiden* (Appleby c. s., 1955).

De 17-oxo-steroiden, die als zodanig in de urine voorkomen,

zijn voor een deel metaboliëten van corticosteroiden, voor een ander deel androgenen uit de bijnieren en de gonaden of metaboliëten daarvan. Bepaling van deze *17-keto-steroiden* geeft dus op zichzelf alleen indruk van de bijnierschorsfunctie, als men aandoeningen van de gonaden kan uitsluiten. De uitkomsten van de verschillende methoden dekken elkaar uiteraard niet. Bij de beoordeling van het door het laboratorium afgegeven getal (mgr/24 uur) moet men weten welke methode is gebruikt en wat met die methode precies wordt bepaald.

Over het algemeen zijn de groepsbepalingen, vooral dank zij de betrekkelijk eenvoudige procedures, geschikt om als routine-methoden in Klinisch-chemische Laboratoria te worden gebruikt. Zij geven een behoorlijke afspiegeling van de totale bijnierschorsfunctie.

3. Bepaling van individuele corticosteroiden.

Hierbij worden de steroiden afzonderlijk bepaald, waarvoor vele van de bovengenoemde groepsreacties natuurlijk geschikt zijn. Het grote verschil met de groepsbepalingen zit in de mate van zuivering van het extract: bij de groepsbepalingen worden de steroiden als groep zoveel mogelijk geïsoleerd van niet-steroiden en niet tot de groep behorende steroiden; bij de individu-bepalingen moeten de steroiden bovendien van elkaar gescheiden worden, wat slechts kan geschieden met behulp van intensieve chromatografie.

Het is deze ver doorgevoerde zuivering die de procedure ingewikkeld en tijdrovend maakt en van de analyticus grote ervaring vereist. Tegenover deze nadelen staat het grote voordeel dat de bijnierfunctie gedifferentieerd wordt benaderd: de gevonden waarden weerspiegelen niet alleen de totale hormoonproductie maar tevens de productie van de hormonen afzonderlijk.

Alle methoden ter bepaling van individuele corticosteroiden in urine volgen in grote lijnen onderstaand schema:

- a. hydrolyse.
- b. extractie.
- c. zuivering van het extract.
- d. chromatografische isolering van de afzonderlijke steroiden.
- e. identificatie van de steroiden.
- f. kwantitatieve bepaling.

Deze onderdelen van de bepaling en de talrijke variaties erop worden uitvoerig besproken in een overzichtsartikel van R. Neher (1958^b).

Een kwantitatief excretiepatroon van de complete corticosteroidenreeks is niet bekend.

Technische moeilijkheden zijn hiervan de oorzaak:

- a. de fysische eigenschappen van de uitersten van de reeks (cortol en DOC) lopen zover uiteen dat extractie, extract-zuivering en chromatografische scheiding met één alles-omvattende procedure nauwelijks mogelijk is.
- b. de chemische eigenschappen van corticosteroiden met een andere dan de α -ketol-zijketen (21-desoxy-zijketen, 20, 21-dihydroxy-zijketen) zijn zodanig dat voor localisatie en kwantitatieve bepaling zeer speciale technieken nodig zijn.

De in de literatuur aangegeven methodieken beperken zich dan ook alle tot bepaalde, meestal kleine gedeelten van het complete spectrum, met een begrijpelijke voorkeur voor de gemakkelijke toegankelijke α -ketol- en Δ^4 -3-oxo-steroiden:

De Courcy, Bush, Gray en Lunnon (1953).

Kinsella en Glick (1953).

Cope en Hurlock (1954).

Richardson, Touchstone en Dohan (1955).

Romani (1956 en 1959).

Johnson, Heftmann en Hayden (1956 en 1959).

Gold, Mac Farlane en Moore (1956 en 1958).

Bush en Willoughby (1957).

Baulieu en Jayle (1957 en 1959).

Romanoff (1957).

Dyrenfurth, Sybulski, Notchev, Beck en Venning (1958).

Onderlinge vergelijking van de door deze onderzoekers verzamelde gegevens is moeilijk omdat de methodieken in vrijwel alle onderdelen zeer uiteenlopen. Hierop wordt in Hoofdstuk IV nader ingegaan.

HOOFDSTUK III

EIGEN METHODIEK

A. Schematisch overzicht. (fig. 2)

Een gedeelte van de 24 uurs urine, meestal 1/5 deel, ondergaat de volgende bewerkingen:

1. Enzymatische hydrolyse bij pH 4,8 en 37°C gedurende 48 uur.
2. Gefractioneerde extractie met 5 x 100 ml chloroform bij pH 1,0 gedurende 24 uur.
3. Zuivering van het extract door wassen met achtereenvolgens natronloog 1,0 N, natronloog 0,1 N en verzadigde NaCl-oplossing. Indampen van het extract in vacuo en verdeling ervan in twee gelijke delen.
4. Gelijktijdige papierchromatografische scheiding van de twee identieke chloroform-extracten op twee afzonderlijke papierstroken in het systeem propyleenglycol/tolueen. Na een ontwikkelingstijd van ± 72 uur is op het papier nog aanwezig een groep steroiden met dezelfde Rf-waarden als resp.: H₄F, H₄E, F. en E, welke als referentie-steroiden op parallelstroken meelopen (stadium I).
De overflow van stadium I wordt opnieuw gechromatografeerd in hetzelfde systeem, nu gedurende ± 15 uur. Op het papier is dan nog aanwezig een groep steroiden met dezelfde Rf-waarden als resp.: H₄B, H₄A en B, welke eveneens als referentie-steroiden meelopen (stadium II).
De overflow van stadium II wordt dan nog een keer gedurende ± 3 uur gechromatografeerd in hetzelfde systeem, met als referentie-steroiden: A en DOC (stadium III).
5. Van de twee extract-stroken wordt een gebruikt voor de uitvoering van enkele chemische reacties op papier, met name de Blue tetrazolium-reactie en de natronloog-fluorescentie in UV licht. Opgeleide van de bevindingen op deze strook en de stroken met referentie-steroiden wordt de tweede extractstrook in stukken geknipt nl. stadium I in vier fracties, stadium II in vier fracties en stadium III in één, twee of drie fracties, naar gelang de bevindingen op de gekleurde extractstrook.
6. Alle fracties worden afzonderlijk geëluëerd voor nadere identificatie en voor kwantitatieve bepaling. Iedere fractie van stadium I wordt gechromatografeerd in systeem Bush C en iedere fractie van stadium II en III in systeem Bush B₁ en wel zodanig dat nauwkeurig gedoseerde hoeveelheden van in aanmerking komende referentie-steroiden meelopen met een verdunningsreeks van de betreffende fractie.

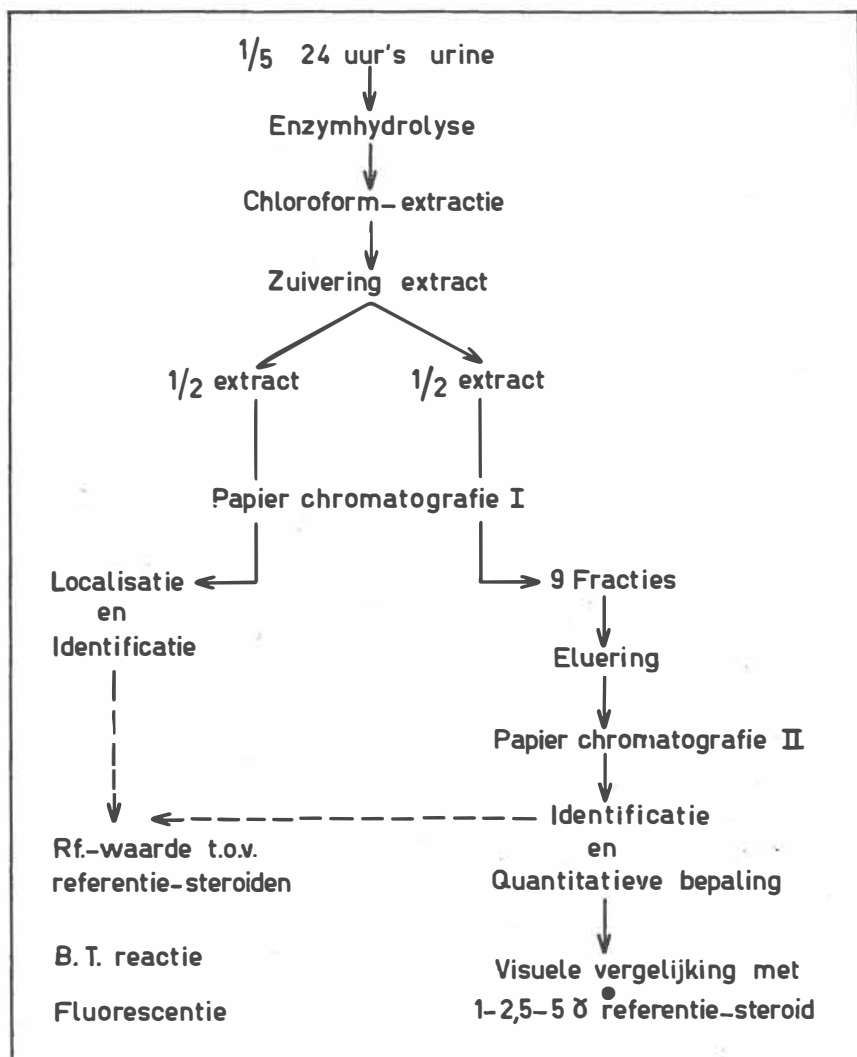


fig. 2. Schema van de methode.

Na de scheiding wordt het papier geïmpregneerd met een alkalische BT-oplossing en worden de blauwe vlekken visueel vergeleken met de bekende concentraties van de referentiesteroiden. Waar het fluorescerende steroïden betreft, wordt ook nog de fluorescentie visueel vergeleken. Door omrekening wordt de concentratie in de 24 uren urine bepaald.

Aldosteron is bepaald volgens een gemodificeerde methode van Neher en Wettstein.

B. Reagentia.

1. Hydrolyse en extractie.

- a. Enzympraeparaat: Suc Helix Pomatia Stabilise (l'Industrie Biologique Française).

Dit praeparaat bevat per ampul van 1 ml 100.000 E glucuronidase en 50.000 E sulfatase.

- b. Chloroform: voor gebruik gezuiverd door wassen met loog en water, gevolgd door destillatie.

2. Chromatografie:

- a. Chromatografie-papier: Whatman No. 1.

- b. Chromatografie-systemen:

- 1) propyleenglycol/tolueen.

- 2) aethylacetaat: tolueen/methanol: gedestilleerd water, in een volume-verhouding van 1:9:5:5 (Bush C).

- 3) tolueen: petroleumaether (Kp. 80-100°C)/methanol: gedestilleerd water, in een volume-verhouding van 5:5:7:3 (Bush B).

- 4) formamide/chloroform.

- 5) formamide/benzeen.

De gebruikte benzeen, tolueen en formamide waren speciaal voor chromatografische doeleinden gezuiverd (Merck). Methanol, aethylacetaat, petroleumaether en propyleenglycol hadden pro-analyse kwaliteit.

- c. Oplossingen van indicator-kleurstoffen:

- 1) F₅ = 4-nitro-2'-methyl-4'-diaethanolamino-azobenzeen en

- 2) F₁₄ = 1,4,5,8-tetra-amino-anthragninon, in een concentratie van $\pm 5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ methanol.

- d. Oplossingen van H₄F, H₄E, F, E, H₄B, H₄A, B, A, DOC in een concentratie van $\pm 5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ methanol.

- e. Blue tetrazolium-reagens: 0,1 % Blue tetrazolium-oplossing in water; vlak voor gebruik 10 x verdund met 2 N natronloog.

- f. DNPH-reagens: 100 mgr 2,4-dinitrophenylhydrazine, opgelost in 100 ml 96% aethanol en 0,1 ml 36% HCl.

- g. Zimmerman's reagens: 1,5 g m-dinitrobenzol, opgelost in 95 ml methanol en 5 ml propyleenglycol; vlak

voor gebruik 1 x verdund met een oplossing van 10 g KOH in 100 ml 80 % methanol.

3. Kwantitatieve bepaling.

a. Blue tetrazolium-reagens.

b. Oplossingen van H_4F , H_4E , F, E, H_4S , H_4B , H_4A , S, B, A in een concentratie van precies $5 \mu g/10 \mu l$ methanol, bewaard in flesjes van 5 ml. hermetisch gesloten met rubber stop.

C. Gedetailleerde beschrijving.

1. Verzamelen van de urine.

De urine wordt zonder toevoeging van een conserveringsmiddel over een periode van precies 24 uur verzameld en na meting van de hoeveelheid of direct in bewerking genomen óf ingevroren bij $-15^{\circ} C$.

Aangezien de excretie van corticosteroiden mogelijk niet geheel onafhankelijk is van de diurese, verdient het aanbeveling om door middel van voldoende vochttoevoer voor een ruime diurese te zorgen, bij voorkeur $\pm 1\frac{1}{2} l$.

Het is wenselijk dat de voeding op de verzameldag zo weinig mogelijk gekleurde bestanddelen bevat om de hoeveelheid urinepigmenten tot een minimum te beperken.

Van de 24 uren urine wordt de helft gebruikt voor de bepaling van aldosteron, meestal $1/5$ deel voor de bepaling van de andere individuele corticosteroiden en de rest voor de bepaling van de 17-hydroxy- en 17-oxo-steroiden volgens Norymberski.

2. Hydrolyse.

In het algemeen wordt $1/5$ deel van de 24 uren portie geïncubeerd met het enzympraeparaat. Wanneer wordt vermoed dat het steroidengehalte aanzienlijk beneden normaal ligt (bij nier- of hypofyse-insufficiëntie), is het beter van $2/5$ deel uit te gaan.

De enzymen worden toegevoegd op basis van 400 E glucuronidase en 200 E sulfatase per ml urine, met een minimum van 150.000 E glucuronidase.

Dit minimum werd wenselijk geacht omdat men anders aan sterk geconcentreerde urines te weinig enzym per eenheid te splitsen substraat toevoegt. Zo zou een bepaalde hoeveelheid steroid-conjugaten slechts de beschikking hebben over 80.000 E glucuronidase wanneer ze toevallig wordt uitgescheiden met 1000 ml urine en over 160.000 E wanneer dezelfde hoeveelheid zich zou bevinden in 2000 ml.

In een poging de hydrolyse enigszins te standaardiseren wordt van de 24 uren porties, die kleiner zijn dan 1750 ml, $1/5$ deel met gedestilleerd water op 375 ml gebracht en wordt $375 \times 400 = 150.000$ E glucuronidase = $1\frac{1}{2}$ ampul toegevoegd.

Vóór de toevoeging van de enzymen wordt de urine onder controle met een pH-meter aangezuurd tot pH 4,8 met ijsazijn en acetaatbuffer. Daarna wordt de aldus voorbereide urine gedurende 48 uur in een broedstoof bij een temperatuur van 37°C bewaard.

Het is mogelijk dat een incubatie-periode van 24 uur reeds voldoende is, zoals in de literatuur wordt aangegeven. Bij een oriënterend onderzoek hierover kregen we echter de indruk dat verlenging van de periode tot 48 uur toch nog een iets grotere opbrengst gaf.

3. Extractie.

Na afloop van de incubatie-periode wordt de urine met geconcentreerd HCl op pH 1,0 gebracht, onder controle met Oxyphen-indicatorpapier.

Aldus kan in aansluiting aan de enzymhydrolyse, gedurende de extractie, nog een hydrolyse door zuur plaats vinden.

Steroiden als aldosteron, die alleendoor hydrolyse met zuur worden vrijgemaakt, kunnen dus worden meebepaald.

De aangezuurde urine wordt vervolgens verzadigd met keukenzout en na toevoeging van 100 ml chloroform gedurende 24 uur geschud in een schudmachine. Tijdens deze extractie-periode wordt de chloroform 4 x ververs, zodat het totale extract tenslotte 500 ml is.

Het noodzakelijke intensieve contact tussen de urine en het extractiemiddel wordt dus bereikt door de twee vloeistoffen mechanisch met elkaar te schudden. Een nadeel van deze extractie-procedure is de grote kans op emulsievorming. Een water-chloroform emulsie kan wel gebroken worden d.m.v. centrifugering maar dit leidt altijd tot verlies van extract. Het is daarom beter het ontstaan van een al te vaste emulsie te voorkomen, wat kan geschieden door de schudfrequentie van de machine te regelen en door de urine vooraf te verzadigen met keukenzout. Op deze wijze is goede extractie mogelijk met een extractverlies van hoogstens 5%. De vijf chloroform-fracties worden telkens in een scheitrechter van de urine gescheiden, samengevoegd en bij 4°C in de ijskast bewaard. Aanvankelijk werd de extractie uitgevoerd met in totaal 300 ml chloroform; deze hoeveelheid is theoretisch aan de zuinige kant en toen bij een oriënterend onderzoek bleek, dat met een grotere hoeveelheid chloroform inderdaad een meer volledige extractie van hoogpolaire steroïden werd bereikt, werden de twee extra extracties met 100 ml ingevoerd.

4. Voorbereiding van het extract voor de papierchromatografie.

Het gekoelde chloroform-extract wordt door wassen met loog van een groot deel der mee-geëxtraheerde urinepigmenten gezuiverd. Achtereenvolgens wordt geschud met:

- a. 25 ml (= 0.05 vol) 1 N NaOH, vooraf gekoeld tot 4°C.
- b. 25 ml 0,1 N NaOH, vooraf gekoeld tot 4°C.
- c. 2 x 25 ml verzadigde NaCl-oplossing.

Door deze zuivering wordt vaak bovendien bereikt dat de altijd aanwezige emulsies worden gebroken.

De wasvloeistof wordt telkens in een scheitrechter van het extract gescheiden en weggegooid. Er vindt dus geen reëxtractie van de wasvloeistoffen plaats om steroïden, die eventueel met de pigmenten in de waterfase zijn overgegaan, terug te winnen. Het steroïdenverlies langs deze weg is nl. zo gering dat het gemotiveerd lijkt om de complicerende reëxtractie achterwege te laten (Romanoff c. s. '57).

Het wassen met loog geschiedt bij lage temperatuur om desintegratie van de steroïden in het alkalisch milieu tot een minimum te beperken.

Het schudden met verzadigde zoutoplossing dient om het alkalisch geworden extract weer te neutraliseren.

Het gezuiverde, neutrale chloroform-extract wordt gedroogd door toevoeging van ± 20 g Na_2SO_4 exsicc. en daarna in vacuo ingedampt bij max. 50°C.

Bij het droogproces moet rekening worden gehouden met absorptie van steroïden aan sulfaatdeeltjes. Na het affiltreren moet de sulfaatmassa dan ook enkele keren worden nagespoeld met chloroform. Gezien de labiliteit van steroïden bij hoge temperatuur dient het indampen van het extract te geschieden door verwarming in een waterbad van max. 50°C. Dank zij het lage kookpunt van chloroform kan zonder veel moeite aan deze eis worden voldaan: met behulp van een watersraalluchtpomp, aangesloten op een destillatiekolf die horizontaal ronddraait in het waterbad, kan 500 ml extract in enkele minuten worden ingedampt tot een zeer klein volume. Het waterbad wordt daarbij thermostatisch op 50°C gehouden.

Het tot enkele milliliters verkleinde extract wordt kwantitatief overgebracht in een puntbuisje. Hierin wordt het, in een stroom zuivere stikstof, door verwarmen in een waterbad van $\pm 50^\circ\text{C}$ geheel drooggedampt. Het residu wordt opgenomen in precies 4 ml chloroform en dan in twee gelijke delen gesplitst.

Deze twee extracten zijn zonder verdere zuivering geschikt om te worden gechromatografeerd in een Zaffaroni-systeem. Meestal is nog wel vrij veel pigment aanwezig maar de kans op mislukking van de chromatografische scheiding door overbelading van het papier is toch zeer gering.

In afwachting van de chromatografie worden de droge extracten bij -15°C bewaard.

5. 1e papierchromatografische scheiding. (fig. 3)

Met behulp van het laagpolaire Zaffaroni-systeem propyleenglycol/tolueen wordt het extract in eerste instantie opgesplitst in negen (soms elf) steroid-fracties.

Dit moet in drie stadia geschieden omdat het zeer grote verschil in polariteit tussen H_4F enerzijds en DOC anderzijds, een scheiding in één bewerking onmogelijk maakt. Voor de drie stadia wordt hetzelfde model papier gebruikt. Een rechthoekig stuk Whatman No. 1 papier (16 x 53 cm) wordt in de lengterichting over een afstand van 47 cm in zes stroken geknipt met een tussenruimte van 1 cm. De middelste twee banen, de *extract*-stroken, zijn $2\frac{1}{2}$ cm breed; de parallelstroken aan weerskanten, de *indicator*-stroken, zijn $1\frac{1}{2}$ cm breed; de beide buitenste banen, van 1 cm breedte, zijn slechts in zoverre van belang dat de ontwikkeling van het chromatogram door hun aanwezigheid regelmatig plaats vindt. De startlijnen worden opgetekend op 12 cm van het gemeenschappelijke boven-eind, zodat de afstand startlijn-ondereind van de stroken 41 cm bedraagt.

De onder-einden van de stroken eindigen in een punt.

Om in stadium II een goede scheiding van de vier fracties te krijgen is het wenselijk dit chromatogram 4 cm langer te maken, zodat de afstand startlijn-ondereind 45 cm bedraagt.

De impregnering van de chromatogrammen met de stationaire fase geschiedt als volgt: 15 ml propyleenglycol wordt in een Erlenmeyer gemengd met 35 ml aceton en dan overgebracht in een rechthoekig, ondiep schaal-tje.

Het chromatogram wordt met behulp van een glasstaaf door dit mengsel getrokken, gelijkmatig afgevoeid tussen dubbel filtreerpapier en dan 5 min. aan de lucht gedroogd om de aceton te laten verdampen.

Het voordeel van de verdunning met aceton is tijd-winst bij de ontwikkeling van het chromatogram: bij impregnering met onverdunde propyleenglycol is de ontwikkelingstijd vele uren langer.

Het afvloeien tussen filtreerpapier is een precare aangelegenheid. De hoeveelheid propyleenglycol, die hiermee weer uit het papier wordt verwijderd, zal uiteraard sterk wisselen, zelfs wanneer de handeling telkens door dezelfde persoon wordt verricht. De van chromatogram tot chromatogram wisselende hoeveelheid propyleenglycol verklaart voor een belangrijk deel het soms grote verschil in loopsnelheid van de steroid-en. Dat de steroid-en soms op de ene strook een grotere afstand per tijdseenheid afleggen dan op een andere, moet worden toegeschreven aan het nauwelijks te voorkomen feit dat het afvloeien onregelmatig is geschied.

Na de impregnering worden de chromatogrammen met de te scheiden steroid-mengsels beladen:

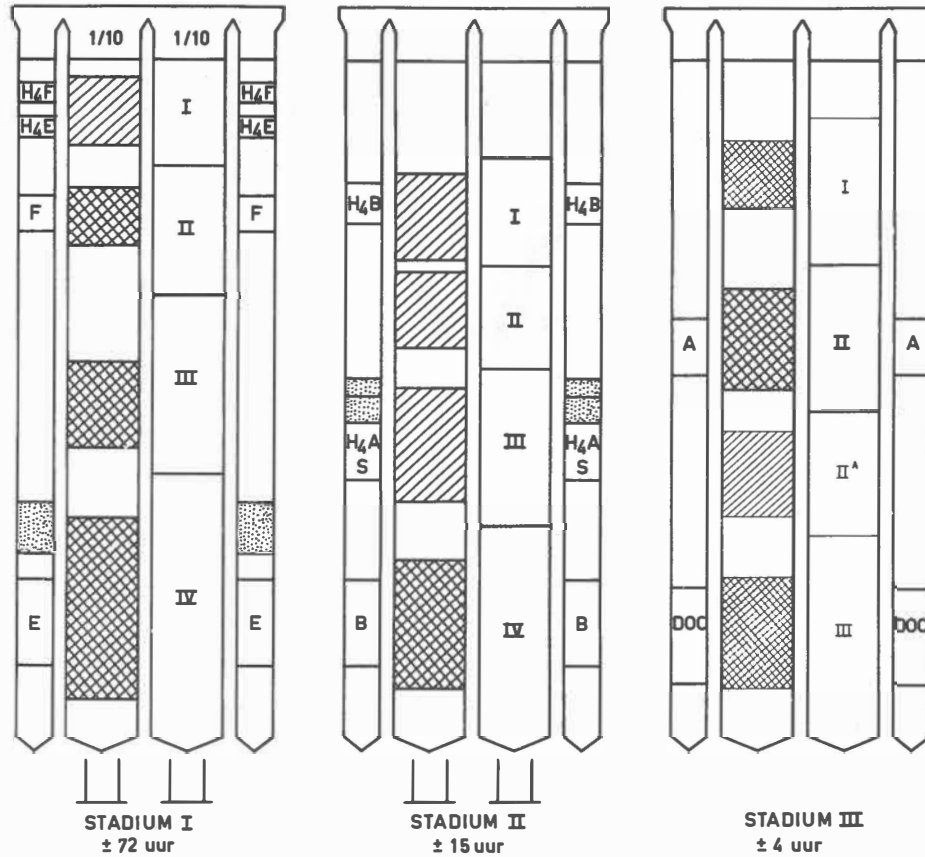


fig. 3. De drie stadia van de 1e chromatografische scheiding.

The three phases of the 1st chromatographic separation.

BT + Fl-

BT + Fl+

indicator-kleurstof
indicator dye

Stadium I:

op de beide extract-stroken de twee helften van het chloroform-extract;

op de beide indicator-stroken de referentie-steroiden H_4F , H_4E , F en E ($\pm 5 \mu g$ van elk) en de blauwe indicator-kleurstof F_{14} .

Stadium II:

op de beide extract-stroken de ingedampde overflow van de overeenkomstige extract-stroken van stadium I;

op de beide indicator-stroken de referentie-steroiden H_4B , H_4A en B ($\pm 5 \mu g$ van elk) ende rode indicator-kleurstof F_5 .

Stadium III:

op de beide extract-stroken de ingedampde overflow van de overeenkomstige extract-stroken van stadium II;

op de beide indicator-stroken de referentie-steroiden A en DOC ($\pm 5 \mu g$ van elk).

De twee extracthelften in stadium I en de ingedampde overflow in stadium II en III worden eerst opgelost in $\pm 100 \mu l$ chloroform/methanol 1:1 en dan met een glascapillair op de startlijnen gebracht; de puntbuisjes worden 2x nagespoeld met $\pm 20 \mu l$ van het oplosmiddel. De referentie-steroiden worden met een micro-pipet van $10 \mu l$ op de startlijnen gebracht.

De startlijnen moeten zo smal mogelijk worden gehouden en mogen de rand van de papierstrook niet bereiken.

Indien de extracten, ondanks de voorafgegane zuivering, nog veel urinepigmenten bevatten, moet de startlijn wel zodanig verbreed worden dat overbelading wordt voorkomen.

Om verdamping van de stationnaire fase uit het papier tot een minimum te beperken, is het gewenst dat de belading van het chromatogram snel geschiedt.

Na de belading wordt het chromatogram in de chromatografietank gehangen: het bovineind in het trogje, het onder eind van de extract-stroken met de punt boven twee maatcilinders, die op de bodem van de tank zijn geplaatst om de overflow op te vangen.

De tank wordt luchtdicht afgesloten en na 1 uur aequilibratie-tijd wordt het trogje gevuld met de lopende fase: 100 ml voor stadium I, 50 ml voor stadium II en III.

Alle chromatografische scheidingen werden uitgevoerd in Shandon-chromatografietanks. In de chromatografiekamer werd de temperatuur met behulp van een thermostatisch geregeld verwarmingselement en een ventilator op $\pm 28^\circ C$ gehouden.

Het moment, waarop de chromatografie moet worden beëindigd wordt vastgesteld met behulp van de indicator-kleurstoffen. Stadium I is geëindigd wanneer het front van de blauwe kleurstof een afstand heeft afgelegd van 30 cm;

Stadium II is geëindigd wanneer het front van de rode kleurstof een afstand heeft afgelegd van 25 cm. Om deze afstanden tijdens de chromatografie te kunnen bepalen, wordt van tevoren op de chromatogrammen een merkstreep getekend op resp. 30 en 25 cm vanaf de startlijn.

Stadium III is geëindigd wanneer het vloeistoffront het onder-eind van het papier heeft bereikt.

Het afbreken van de chromatografie op het juiste moment is voor het verkrijgen van betrouwbare, gestandaardiseerde resultaten van het grootste belang. Wanneer nl. het chromatogram in stadium I en II te vroeg uit de bak wordt gehaald, heeft de bedoelde scheiding in vier fracties niet compleet plaatsgevonden. Wanneer het chromatogram te lang wordt ontwikkeld, zal in stadium I de E-fractie en in stadium II de B-fractie geheel of gedeeltelijk van het papier zijn afgelopen. In beide gevallen wordt de methode onnodig gecompliceerd en alle onderzoekers, die het propyleenglycol/toluëen-systeem op de besproken wijze gebruiken voor de eerste fractionering, hebben dan ook gezocht naar criteria om deze complicaties te voorkomen.

Romani neemt de tijd als criterium voor de beëindiging van de chromatografie; ± 72 uur voor stadium I en ± 15 uur voor stadium II. Naar onze ervaring is dit criterium zeer onbetrouwbaar: de tijd, die nodig heeft om het onderste 1/5 deel van het chromatogram te bereiken, kan nl. per bepaling wisselen van ± 50 uur tot ± 90 uur. Een dergelijke variabiliteit in loopsnelheid vertoont ook B in stadium II ($\pm 13 - 20$ uur). Dit grote verschil in loopsnelheid van de steroïden hangt mogelijk samen met de hoeveelheid pigmenten en steroïden die de mobiele fase moet verslepen; een andere factor, waarschijnlijk van groter belang, is de hoeveelheid stationnaire fase in het papier. In ieder geval zijn het factoren die men niet volledig in de hand heeft.

Richardson c. s. hebben de aanvankelijk gebruikte tijdsfactor dan ook als criterium laten vallen en gaan af op de hoeveelheid overflow die zich tijdens de chromatografie in de maatcilinders verzamelt. Ook dit criterium bleek, althans in onze handen, niet geheel betrouwbaar: de overflow van stadium I kan variëren van 13-18 ml, de overflow van stadium II van 2-3 ml (moeilijk afleesbaar tijdens de chromatografie). Ondanks gebruik van beide criteria was het aantal gedeeltelijke mislukkingen zo groot dat wij vanaf het begin hebben gezocht naar gekleurde substanties, die in het gebruikte systeem toevallig dezelfde Rf-waarden zouden hebben als resp. E en B. Nadat talrijke kleurstoffen zonder resultaat waren getest, werd een beroep gedaan op de specialisten Neher en Weustein die ons de gezochte kleurstoffen ter beschikking

stelden (F_5 en F_{14} worden beschreven in de *Helv. chim. Acta* 42, 132, 1959).

F_{14} is geenhomogene stof: de voornaamste component heeft een $Rf_E = \pm 0,9$; een andere component is lichtpaars en is op het chromatogram even zichtbaar op een plaats tussen de referentie-steroiden H_4F en H_4E .

F_5 is homogeen en heeft een $Rf_B = \pm 0,6$.

Na de ontwikkeling wordt het chromatogram uit de tank genomen en snel gedroogd in een warme luchtstroom (föhn). Om zoveel mogelijk van de weinig vluchtige stationnaire fase uit het papier te verwijderen, blijft het chromatogram nog een nacht in de chromatografiekamer hangen.

Onmiddellijk na beëindiging van stadium I en II wordt de overflow bij $50^\circ C$ in vacuo ingedampt. Het residu wordt opgenomen in chloroform/methanol 1:1 en op de startlijn van het volgende chromatogram gebracht.

6. Localisatie van de steroiden.

Van het gedroogde chromatogram wordt eerst een fotocopie met UV licht gemaakt.

Met behulp van een raam, bespannen met elastische draden, wordt het chromatogram op een licht gebogen onderlaag stevig tegen een vel Document contactpapier gedrukt. Dit wordt gedurende ± 7 sec. belicht door een Philips bactericide lamp (TUV 15 W), die zich op ± 1 m afstand bevindt. Deze lamp zendt UV licht uit met een maximum bij $254 m\mu$.

Op het ontwikkelde negatief zijn de plaatsen, waar het chromatogram UV-absorberend materiaal bevat, als witte zones zichtbaar.

De fotocopie is in drie opzichten van belang:

- a. men kan door vergelijking van de witte zones op de twee extract-stroken nagaan of de chromatografische scheiding zich op beide stroken op identieke wijze heeft voltrokken. Indien dit niet het geval is en de overeenkomstige zones zich dus niet op dezelfde hoogte bevinden, moet men hiermee in een latere fase van de bepaling rekening houden.
- b. men krijgt reeds in dit stadium van de bepaling een indruk van de concentratie Δ^4 -3-oxo-steroiden.
- c. men kan de resultaten van de chemische localisatiebepaling op de foto optekenen; zodoende heeft men de beschikking over een document, waarop het complete resultaat van de 1e chromatografische scheiding is neergelegd.

Vervolgens worden de linker extract-strook en de beide stroken met referentie-steroiden onderworpen aan enkele chemische reacties, waarmee de gechromatografeerde steroiden worden gelocaliseerd en geïdentificeerd.

Nadat de rechter extract-strook is afgeknipt, wordt het chromatogram met behulp van een glasstaaf door een plat schaalpje

getrokken, waarin zich vers bereid Blue tetrazolium-reagens bevindt. Het aldus geïmpregneerde chromatogram wordt op een melkwitte glasplaat gelegd. Na de kleurontwikkeling worden de BT-positieve vlekken afgetekend. Het chromatogram wordt op de glasplaat eerst gedurende ± 15 minuten aan de lucht en dan gedurende ± 30 minuten in een droogoven bij 90°C gedroogd. Onder de UV-lamp (Philips HPW, 125 W, max. straling bij $365\text{ m}\mu$) wordt de matgele fluorescentie van de Δ^4 -3-oxosteroiden opgewekt en op het papier aangegeven.

Aanvankelijk werd de linker extract-strook bovendien nog beoordeeld na uitvoering van de DNPH-reactie en de Zimmerman-reactie. Daartoe werd de strook overlans in drie repen geknipt. De centrale strook, 1 cm breed, werd gebruikt voor de BT-reactie; de beide kantstroken werden op de beschreven wijze geïmpregneerd met het DNPH-resp. Zimmerman's reagens.

Nadat met deze procedure voldoende inlichtingen waren verkregen, werden de beide laatste reacties niet meer als routine uitgevoerd.

Voor de belangrijke BT-reactie werd in het vervolg de complete linker extract-strook gebruikt, zodat beoordeling van de BT-positieve vlekken over de hele breedte van de strook mogelijk werd. Hierdoor kon de plaatsbepaling met grotere nauwkeurigheid geschieden.

Door toepassing van de combinatie Blue tetrazolium-reactie en natronloog-fluorescentie worden op de drie chromatogrammen in totaal negen reagerende zones zichtbaar (fig. 3):

In stadium I vier fracties:

Fractie I: een zeer intensieve BT-positieve vlek ter hoogte van de referentie-steroiden H_4F en H_4E ; indien weinig materiaal aanwezig is, treedt in deze vlek een scheiding op overeenkomstig de scheiding tussende twee referentie-steroiden. Op twee plaatsen is fluorescerend materiaal aanwezig, waarschijnlijk Reichstein's E en Reichstein's U.

Fractie II: een BT-positieve, Fl-positieve vlek ter hoogte van het referentie-steroid F.

Fractie III: meestal één BT-positieve, Fl-positieve vlek, gelegen tussen de referentie-steroiden F en E.

Fractie IV: een BT-positieve, Fl-positieve vlek ter hoogte van het referentie-steroid E.

In stadium II eveneens 4 fracties:

Fractie I: meestal één BT-positieve, Fl-negatieve vlek ter hoogte van het referentie-steroid H_4B . De DNPH-reactie is in dit gebied altijd duidelijk positief.

Fractie II: een BT-positieve, Fl-negatieve vlek, gelegen tussen de referentie-steroiden H_4B en H_4A .

Fractie III: een BT-positieve, Fl-negatieve vlek ter hoogte van het referentie-steroid H₄A. Met het Zimmerman's reagens is in dit gebied altijd een paarse vlek aantoonbaar.

Fractie IV: een BT-positieve, Fl-positieve vlek ter hoogte van het referentie-steroid B.

Aanvankelijk werd dit stadium in drie fracties verdeeld, waarbij de boven beschreven fracties I en II werden samengevoegd, omdat vaak geen duidelijke scheiding tussen deze twee kon worden vastgesteld. Dank zij verlenging van het chromatogram met 4 cm en een betere beheersing van de chromatografie met behulp van de kleurstof-indicator bleek het later vrijwel altijd mogelijk een goede scheiding tot stand te brengen in wat vroeger fractie I werd genoemd.

In stadium III is meestal slechts één fractie aanwezig, nl. een zwak BT-positieve, Fl-positieve vlek ter hoogte van het referentie-steroid A.

Vaak bevat de onderste helft van dit chromatogram grote hoeveelheden urinepigmenten, wat de beoordeling van de zoner ter hoogte van de referentie-steroiden A en DOC moeilijk en soms onmogelijk maakt.

Alle beschreven bevindingen worden opgetekend op de UV-fotocopie, zodat de plaatsen van de referentie-steroiden op de indicator-stroken en van urinesteroid-fracties op de linker extract-strook in onderling verband afleesbaar zijn.

Op geleide van dit complete overzicht wordt dan de rechter extract-strook in de overeenkomstige fracties verdeeld.

Indien de UV-absorberende zones op de twee extract-stroken zich blijken te fotocopie niet op dezelfde hoogte bevinden, dan zal men naar analogie ook de overige zones op de rechter extract-strook iets hoger of lager moeten localiseren dan de linker strook aangeeft.

Ingevallen van pathologische of iatrogene bijnierhyperfunctie worden soms meer fracties zichtbaar dan in dit algemene overzicht is weergegeven.

7. 2e papierchromatografische scheiding.

De rechter extract-strook, waarop de plaats van de steroid-fracties nauwkeurig bekend is zonder dat de strook zelf is aangetast, wordt gebruikt voor nadere identificatie en quantitative bepaling in één tempo. De fracties worden daartoe uitgeknipt en na eluering één voor één aan een 2e papierchromatografische scheiding onderworpen.

De eluering geschiedt als volgt:

Elke papierfractie wordt in smalle repen geknipt en in scheitrechters van 100 ml met 25 ml gedestilleerd water tot pulp geschud. Dan wordt 3 x (de twee polaire fracties 5 x) geschud met 15 ml chloroform. De drie resp. vijf chloroform-extracten worden gecombineerd en 1 x geschud met 20 ml gedestil-

leerd water, waardoor propyleenglycol- en papierresten worden verwijderd.

Het extract wordt gedroogd met Na_2SO_4 exsicc., in vacuo bij 50°C ingedampt en dan quantitatief overgebracht in een puntbuisje. In afwachting van de chromatografie worden de puntbuisjes bij -15°C bewaard.

Het chromatogram, waarop de tweede scheiding plaats vindt, is een rechthoekig stuk Whatman No. 1 papier (19×46 cm), dat in de lengterichting over een afstand van 40 cm in acht stroken van $1\frac{1}{2}$ cm breedte is geknipt met tussenruimten van 1 cm. De startlijnen worden getekend op 10 cm van de bovenrand, zodat de chromatografie plaats vindt over een afstand van 36 cm.

De vier fracties van stadium I worden gechromatografeerd in het systeem Bush C, de overige fracties in het systeem Bush B₁. Het deel van de fractie dat op de startlijn wordt gebracht, de keuze van de referentie-steroiden die meelopen en de duur van de ontwikkeling, wisselt van fractie tot fractie.

Voordat deze variabele factoren voor elke fractie afzonderlijk worden besproken, volgt eerst een algemeen overzicht van de procedure.

Het papier is zonder enige voorbereiding geschikt om met de steroid-mengsels te worden beladen.

De extracten, altijd gedeelten van de totale fractie, worden opgelost in methanol/chloroform 1:1 en met een glascapillair quantitatief op de startlijnen gebracht; een op het papier gerichte stikstofstroom zorgt voor snelle verdamping van het oplosmiddel, zodat uitvloeien van het extract over te grote afstand wordt voorkomen.

De referentie-steroiden moeten met het oog op de quantitative bepaling zeer nauwkeurig worden gedoseerd in hoeveelheden van $1\frac{1}{4}$, $2\frac{1}{2}$ en $5 \mu\text{g}$, overeenkomend met resp. $2\frac{1}{2}$, 5 en $10 \mu\text{l}$ standaardoplossing.

De standaardoplossingen worden bereid door 2 mgr van elk steroid op een microbalans af te wegen en op te lossen in 4 ml methanol. Om verandering van de concentratie door verdamping van het oplosmiddel te voorkomen, moeten deze oplossingen worden bewaard in flesjes met rubberstoppen, die na sluiting niet meer mogen worden geopend. Aangezien steroiden in kristallijne vorm beter houdbaar zijn dan in oplossing, worden om de vier tot zes weken verse oplossingen bereid, die worden bewaard in een koelkast.

Om de kleine hoeveelheden vloeistof nauwkeurig te kunnen doseren, wordt gebruik gemaakt van een "Agla"-micrometerspuit.

Ook hier zorgt een stikstofstroom weer voor snelle verdamping van het oplosmiddel.

De beladen chromatogrammen worden 's avonds in de chromatografietanks gehangen en de volgende morgen, dus na een lange aequilibratieperiode, ontwikkeld door het trogje te vullen met de mobiele fase. Na beëindiging van de chromatografie wordt het chromatogram met behulp van een föhn gedroogd en op de beschreven wijze onderworpen aan de RT- en fluorescentie-reactie.

De BT-positieve en Fl-positieve vlekken op de extract-stroken worden weer vergeleken met de referentie-steroiden, nu niet alleen wat betreft de Rf-waarde, maar ook naar quantiteit.

De bewerking van de fracties kan niet uniform geschieden:

- a. Er lopen telkens andere referentie-steroiden mee, die uiteraard worden gekozen op grond van de bevindingen op het eerste chromatogram: het referentie-steroid, dat in het propyleenglycol/tolueen-systeem ongeveer dezelfde Rf-waarde heeft als een bepaalde fractie, moet ook tijdens de 2e chromatografie met deze fractie meelopen. Het is immers waarschijnlijk dat deze fractie, gezien de overeenkomst in chemische eigenschappen en Rf-waarde, als voornaamste component een steroid bevat, dat identiek is met het referentie-steroid.

- b. Er moeten tenminste twee systemen worden gebruikt en bovendien nog variërende ontwikkelingstijden.

Voor een goede scheiding is het nodig dat de polariteit van het systeem voor de 2e scheiding aangepast wordt aan de polariteit van de fracties in het propyleenglycol/tolueen-systeem.

De hoogpolaire steroiden, uit de vier fracties van stadium I zijn binnen redelijke tijd goed te scheiden in het polaire systeem Bush C. De fracties van stadium II en III hebben in dit systeem een veel te grote en onderling te weinig verschillende Rf-waarde. Scheiding van deze fracties in individuele componenten is alleen goed mogelijk in een minder polair systeem bijv. Bush B₁. Door de ontwikkelingstijd van de verschillende fracties te variëren, kan met dit minimum van twee systemen worden volstaan.

- c. Er moeten met het oog op een betrouwbare quantitatieve bepaling sterk uiteenlopende gedeelten van de fracties op de startlijnen worden gebracht.

Voor een betrouwbare visuele schatting van de quantiteit is het noodzakelijk dat van elke fractie een zodanig gedeelte wordt gechromatografeerd, dat de daarin aanwezige hoeveelheid van het te bepalen steroid tussen 1 en 5 μ g ligt. Het vaststellen van dit gedeelte is moeilijk, omdat het steroid-gehalte van fractie tot fractie en in dezelfde fractie van bepaling tot bepaling sterk wisselt. Een goede methode om deze moeilijkheid te ondervangen is het chromatograferen

van een verdunningsreeks van een fractie. Met behulp van chloroformen een 1 of 2 cc pipet worden verdunningen gemaakt volgens de reeks 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 enz. Uit deze reeks worden een of meer verdunningen op aparte stroken gechromatografeerd; op tussenliggende stroken loopt de beschreven verdunningsreeks mee van de standaardoplossing van het in aanmerking komende referentie-steroid.

Het voordeel van deze werkwijze is dat men een grotere kans heeft het te bepalen steroid op een van de stroken in de gewenste hoeveelheid aan te treffen. Indien dit op meer dan een strook het geval is kan men twee of drie concentraties vergelijken wat de nauwkeurigheid van de bepaling ten goede komt.

Als een fractie twee steroiden in uiteenlopende concentraties bevat, is het dank zij de verdunningsreeks vaak mogelijk om beide op één chromatogram kwantitatief te bepalen (vgl. fractie I/I).

In het volgende overzicht wordt voor alle fracties afzonderlijk aangegeven welk referentie-steroid in aanmerking komt, hoelang het chromatogram ontwikkeld moet worden en welke verdunningsreeks wordt aanbevolen, indien wordt uitgegaan van 1/5 deel van de 24 uren urine van normale personen.

Fractie	Referentie-steroiden	Ontwikkelingsduur	Verdunningsreeks
I/I	H ₄ F en H ₄ E	± 5 uur in Bush C	1/32-1/64-1/128
I/II	F	± 3 uur in Bush C	1/2-1/4
I/III	F	± 3 uur in Bush C	1/2
I/IV	E en H ₄ S	± 2 uur in Bush C	1/4-1/8
II/I	H ₄ B	± 8-10 uur in Bush B ₁	1/8-1/16
II/II	H ₄ A	± 8 uur in Bush B ₁	1/8-1/16
II/III	H ₄ A	± 6-8 uur in Bush B ₁	1/4-1/8
II/IV	B	± 6 uur in Bush B ₁	1/2-1/4
III/I	A	± 4 uur in Bush B ₁	1/2-1/4

Om tenminste één duplo-bepaling te kunnen doen, wordt nooit een onverdeelde fractie gechromatografeerd.

De factor, waarmee de geschatte hoeveelheid moet worden vermenigvuldigd om de concentratie van het steroid in de 24 uren urine te berekenen, wordt bepaald door het gedeelte van de 24 uren urine waarvan is uitgegaan en de fractieverdunning waarin de schatting is verricht.

Ter verduidelijking van bepaalde onderdelen van de methodiek volgen nog enkele praktische opmerkingen:

1. Een essentieel punt in de gevolgde procedure is het bezit van een groot aantal referentie-steroiden in zodanige hoeveelheden, dat voortdurend verse standaardoplossingen kunnen worden bereid.

Kleine hoeveelheden van de meest voorkomende steroiden kan men aanvragen bij de "Steroid Reference Collection" van de British Medical Research Council (Dr. W. Klyne, Postgraduate Med. School, London W 12) en de "U. S. P. Reference Standards", 46 Park Avenue, New York. Voor de meer zeldzame steroiden en in het algemeen voor grotere hoeveelheden is men aangewezen op voortdurende medewerking van de Pharmaceutische Industrie.

Indien het gewenste steroid niet verkrijgbaar is, kan men de visuele schatting soms toch uitvoeren met behulp van een ander α -ketol-steroid dat in het gebruikte systeem toevallig een zelfde Rf-waarde heeft. Dit wordt geïllustreerd door het gebruik van H₄A als referentie-steroid bij de chromatografie van Fractie II/II. Deze fractie bevat nl. allo-H₄B als voornaamste component, zodat dus allo-H₄B voor deze fractie het ideale referentie-steroid is.

Aangezien dit steroid niet in ons bezit was, hebben wij gebruik gemaakt van de toevallige omstandigheid dat H₄A in het Bush B₁-systeem dezelfde Rf-waarde heeft als allo-H₄B. Hierbij is aangenomen dat de kleurintensiteit van het BT-reactieproduct voor de twee steroiden per gewichtseenheid gelijk is.

De visuele schatting wordt minder betrouwbaar wanneer twee steroiden met verschillende Rf-waarden worden vergeleken. Dit hangt samen met het feit dat de diffusie van de vlek toeneemt, naarmate een grotere afstand over het papier wordt afgelegd. En aangezien de kleurintensiteit wordt bepaald door de hoeveelheid steroid per cm² papieroppervlak, moet men dus een kleine, intensief gekleurde vlek vergelijken met een grote, minder intensief gekleurde!

Indien enigszins mogelijk moet dus van elk steroid, dat in een fractie aanwezig is, altijd het overeenkomstige referentie-steroid in drie concentraties meelopen; wanneer hieraan niet kan worden voldaan moet, force majeure, worden vergeleken met het dichtstbijgelegen referentie-steroid.

Het is duidelijk dat de methode betrekkelijk grote hoeveelheden referentie-materiaal verbruikt die moeilijk zijn aan te vullen. Daar staat echter tegenover dat dank zij deze wijze van kwantitatieve bepaling de tijdwinst aanzienlijk is (vgl. blz. 35).

2. Uit het genoemde feit, dat H₄A en allo-H₄B in het Bush B₁-systeem dezelfde Rf-waarde hebben, blijkt het belang van een geslaagde eerste chromatografie. Wanneer de scheiding in het propyleenglycol/tolueen-systeem onvoldoende is geweest kan dit niet in het Bush-systeem worden goedgemaakt.

De fracties II/II en II/III mogen ook nooit worden samengevat zoals aanvankelijk door ons werd gedaan met de fracties II/I en II/II.

3. Bij de kwantitatieve bepaling van BT-positieve, Fl-positieve steroiden is het wenselijk de intensiteit van beide reacties te vergelijken met de standaard-steroiden. Bij grove discrepantie tussen de twee uitslagen moet worden betwijfeld of de gemeten vlek wel homogeen is. Het is ons opgevallen dat er altijd een uitstekende overeenstemming is voor wat betreft F, E en A, maar dat bij de bepaling van B de discrepantie vaak zeer opvallend is.

Speciaal wanneer slechts weinig B aanwezig is en dus een groot gedeelte van de betreffende fractie moet worden gechromatografeerd, geeft de BT-reactie vaak een veel hogere uitslag dan de fluorescentie-reactie.

In deze gevallen hebben wij aangenomen dat zich ter plaatse nog een ander α -ketol-steroid bevindt of een verontreiniging met specifiek reagerend materiaal. De concentratie van B werd dan berekend alleen op grond van de fluorescentie-vergelijking.

4. Na enige ervaring gelukt het meestal om d.m.v. enkele kortsluitingen veel tijd te besparen.

a. wanneer de hoeveelheid pigment niet te groot is en er dus geen risico bestaat voor overbelading, is het mogelijk om de twee stroken van het eerste chromatogram te gebruiken voor twee complete urine-extracten. Men heeft dan geen parallelstrook voor de uitvoering van chemische reacties, maar dat is voor stadium I niet zo belangrijk, omdat drie van de vier fracties hun aanwezigheid wel verradendoor absorptie van UV licht. Voor stadium II is de aanwezigheid van een identieke parallelstrook wel noodzakelijk, omdat hier de BT-reactie onmisbaar is voor het localiseren van de eerste drie fracties.

De verdeling van het extract in twee helften wordt als het ware verplaatst naar de overflow van stadium I; vanaf dat punt loopt de bepaling zoals is beschreven. Aangezien juist stadium I zoveel tijd vergt (± 72 uur), betekent de gelijktijdige scheiding van twee verschillende extracten in dit deel van de bepaling belangrijke tijdswinst.

b. door gebruik te maken van de talrijke combinatiemogelijkheden op de chromatogrammen van de 2e chromatografie, kan men proberen een maximum aan gegevens te verkrijgen in een minimum aan tijd.

Enkele voorbeelden maken dit duidelijk:

- 1) met het referentie-steroid F op de drie indicator-stroken en $2 \times 1/4$ I/II en $2 \times 1/2$ I/III op vier van de vijf extract-stroken, zijn in één tempo van twee personen twee fracties afgewerkt.
- 2) met de referentie-steroiden H_4B en H_4A op de drie indicator-stroken en $1/8$ II/I, $1/8$ II/II en $1/8$ II/III op drie van de vijf extract-stroken, zijn in één tempo drie

fracties van fase II afgewerkt. Eventueel kunnen op de twee overblijvende stroken nog twee fracties van een andere patient meelopen.

Dit samenbrengen van zoveel mogelijk fracties op één chromatogram mag niet worden toegepast op fractie I/I. De grote massa steroiden in deze fractie maakt het noodzakelijk zeer grote verdunningen te chromatograferen. De vermenigvuldigingsfactor, die moet worden gebruikt om de afgelezen concentratie om te rekenen, is zó groot, dat een geringe schattingsfout de einduitslag sterk beïnvloedt. Om deze fout tot een minimum te beperken, moet niet worden afgeweken van de regel dat deze fractie in tenminste drie verdunningen moet worden gechromatografeerd.

KWANTITATIEVE BEPALING VAN ALDOSTERON

Dank zij de hydrolyse door zuur kan aldosteron in principe worden bepaald met de beschreven methodiek.

In het systeem propyleenglycol/tolueen heeft dit steroid eenzelfde Rf-waarde als E; het bevindt zich dus in fractie I/IV en is van F gescheiden.

In het systeem Bush C heeft aldosteron eenzelfde Rf-waarde als F en wordt het van E gescheiden. De kwantiteit kan na afloop van de 2e chromatografie direct worden vastgesteld door visuele vergelijking met het referentie-steroid F.

Een groot practisch bezwaar is echter dat de hoeveelheid aldosteron meestal te gering is om te kunnen worden afgelezen. Onder normale omstandigheden bevat de 24 uurs urine nl. gemiddeld $5\mu\text{g}$ aldosteron. Wanneer men uitgaat van 1/10 deel van de urine en van fractie I/IV de helft chromatografeert, bevindt zich dus $1/4\mu\text{g}$ aldosteron op het papier. Het is duidelijk dat een betrouwbare schatting dan niet mogelijk is.

Het komt er in de praktijk op neer dat aldosteron alleen dan kan worden meebepaald, wanneer de excretie aanzienlijk verhoogd is. In alle andere gevallen kan aldosteron slechts worden bepaald in urineporties die aanzienlijk groter zijn dan 1/10 deel van de dagproductie, bijv. 1/3 of 1/2. Deze hoeveelheid kan niet door de beschreven methodiek worden verwerkt, zodat een andere procedure noodzakelijk is, die zich uitsluitend richt op de bepaling van aldosteron.

Wij hebben voor deze bepaling in grote lijnen de methode van Neher en Wettstein gevolgd, waarin de volgende wijzigingen werden aangebracht:

- 1) De extractie en extractzuivering vindt plaats volgens de methodiek van Moolenaar (1958): de helft van de 24 uurs urine wordt aangezuurd tot pH 1 en gedurende 24 uur geëxtraheerd met 4 x 125 ml chloroform. Het gecombineerde chloroform-extract wordt op de beschreven wijze gezuiverd door wassen

met loog en verzadigde NaCl-oplossing. Het in vacuo ingedampte extract wordt onderworpen aan een vloeistofpartitie in het mengsel petroleumaether:methanol:water(100 : 80 : 20).

De methanol-water fase wordt in vacuo ingedampt en is dan geschikt voor een chromatografische scheiding in het systeem formamide/chloroform, zoals beschreven door Neher en Wettstein (J. clin. Invest. 35: 800, 1956). Meestal wordt de helft van het extract op de startlijn gebracht.

2) De E-zone van het chromatogram wordt geëluëerd op de wijze zoals beschreven in dit hoofdstuk, dus anders dan aangegeven door Neher en Wettstein.

De definitieve isolering en kwantitatieve bepaling in het systeem Bush C is ongewijzigd gebleven.

HOOFDSTUK IV.

RESULTATEN.

A. Inleiding.

De resultaten, die tot dusver met de beschreven methodiek zijn verkregen, omvatten ongeveer 60 corticosteroid-spectra afkomstig van personen met normale of pathologische bijniere, al of niet na beïnvloeding van de steroid-synthese door stimulatie of blokkering.

Met een spectrum wordt bedoeld het excretie-patroon van de biologisch actieve corticosteroiden en hun α -ketol-metaboliëten; vrijwel alle corticosteroiden met een ander zieketentype zijn buiten beschouwing gelaten. Deze beperking, die wij ons om technische redenen moesten opleggen (blz. 40), houdt in dat de hormoonproductie slechts ten dele wordt benaderd.

De resultaten worden in de eerste plaats vermeld als illustratie van de bruikbaarheid en mogelijkheden van de methodiek. Er is geen poging gedaan een bepaald facet van de bijnierschorsproblematiek met een gericht onderzoek te benaderen. De interpretatie van de waarnemingen zal, gezien het kleine materiaal en de bovengenoemde beperking, met grote reserve geschieden.

Bij de bepalingen is uiteraard de meeste aandacht besteed aan de corticosteroiden die blijkens de literatuur met zekerheid uit urine zijn geïsoleerd en geïdentificeerd en waarvan de herkomst vaststaat. Deze steroiden zijn in de tabellen en diagrammen met name genoemd voor zover hun identiteit ook door ons, met de beperkte middelen van een Klinisch-chemisch Laboratorium, met aan zekerheid grenzende waarschijnlijkheid werd vastgesteld.

In de tabellen zijn bovendien vele niet-geïdentificeerde vlekken, die vrij regelmatig op de chromatogrammen werden waargenomen, met de letter-aanduidingen X, Y en Z aangegeven. De opgegeven kwantiteit van deze onbekende substanties is slechts een benadering daar de schatting moest geschieden door vergelijking met referentie-steroiden die niet identiek waren. De hoeveelheid is meestal zo gering dat deze substanties niet altijd zichtbaar worden in fractieverdunningen die optimaal zijn voor de bepaling van het voornaamste steroid in de fractie. In het algemeen kan worden gezegd dat meer reagerend materiaal zichtbaar wordt, naarmate een groter gedeelte van de fracties wordt gechromatografeerd. Uit het ontbreken van een substantie in een bepaald spectrum mag niet zonder meer worden geconcludeerd dat de urine in kwestie deze substantie niet bevat.

Over de identiteit kan het volgende worden opgemerkt:

1. op grond van gegevens uit de literatuur is het mogelijk dat enkele van de niet-geïdentificeerde vlekken corticosteroiden vertegenwoordigen, bijv. allo-H₄A (Y₂) en H₄DOC (Z₂). Zekerheid hieromtrent kon niet worden verkregen door het ontbreken van referentie-materiaal.
2. andere vlekken moeten waarschijnlijk worden beschouwd als a-specifiek reagerend materiaal dat met steroiden niets uitstaande heeft.
3. weer andere vlekken kunnen soms worden geïnterpreteerd als "artefacten" van de bepaling. Wanneer nl. een fractie materiaal bevat met eenzelfde Rf-waarde en dezelfde chemische eigenschappen als een steroid uit een aangrenzende fractie, dan ligt het voor de hand om aan te nemen dat het uitknippen van de fracties onjuist is geschied. Een andere mogelijkheid is nog dat fractie II/I en fractie III/I steroiden bevatten die thuishoren in resp. fractie I/IV en fractie II/IV maar, tegen de bedoeling in, met de overflow van resp. stadium I en stadium II van het papier zijn afgelopen.

B. Overzicht van de kwalitatieve analyse.

Voor iedere fractie afzonderlijk zal de aard worden aangegeven van de substanties die na afloop van de definitieve chromatografische scheiding op het papier werden aangetoond (Overzichtstabel).

Sporadisch gevonden vlekjes zijn buiten beschouwing gelaten. Van alle andere substanties worden de chemische eigenschappen genoemd, voor zover deze zijn bepaald, en de relatieve Rf-waarden ten opzichte van referentie-steroiden in de gebruikte chromatografische systemen.

Fractie I/I bevat twee geïdentificeerde steroiden: H₄F en H₄E. Beide zijn BT-positief en Fl-negatief. De Rf-waarden in de systemen propyleenglycol/tolueen, Bush C en formamide/chloroform zijn gelijk aan die van authentiek H₄F en H₄E.

In deze fractie zijn verder nog aanwezig:

1. een BT-positieve, Fl-negatieve substantie met een Rf_{H₄E} in de systemen propyleenglycol/tolueen, Bush C en formamide/chloroform van resp. 1,0; 0,8; 0,5.

De chemische eigenschappen en het chromatografisch gedrag, gecombineerd met gegevens uit de literatuur, maken het vrijwel zeker dat deze substantie allo-H₄F is. In de tabellen en diagrammen is de naam tussen aanhalingstekens geplaatst omdat directe vergelijking met authentiek allo-H₄F niet kon geschieden. Aanvankelijk werd niet bewust naar allo-H₄F gezocht, zodat dit steroid alleen in de recent bepaalde spectra voorkomt.

2. een BT-negatieve, Fl-positieve substantie met een $R_{F_{H_4E}}$ in de systemen propyleenglycol/tolueen en Bush C van $\pm 0,2$. Mogelijk is deze substantie Reichstein's E.

Er is geen poging gedaan tot kwantitatieve bepaling omdat met chloroform slechts een deel van dit hoogpolaire steroid uit de urine wordt geëxtraheerd; bovendien ontbrak een referentie-steroid met een enigszins vergelijkbare R_F -waarde.

De substantie is niet aangegeven in de tabel.

Fractie I/II bevat het geïdentificeerde steroid F: BT-positief, Fl-positief en DNPH-positief. Fluorescentie in 70% fosforzuur felgeel. De R_F -waarde in de systemen propyleenglycol/tolueen, Bush C, Bush B₁ en formamide/chloroform is gelijk aan die van authentiek F.

Verder is in deze fractie aanwezig een Fl-positieve substantie die soms ook een zwakke BT-reactie geeft. De R_F in systeem propyleenglycol/tolueen is 0,85; in systeem Bush C 0,5; in systeem formamide/chloroform 1,25. Waarschijnlijk is deze substantie Reichstein's U, in de tabel aangegeven als "U"; hoewel er niet consequent naar werd gezocht, is dit steroid vrijwel altijd aangetoond en "semi-kwantitatief" bepaald.

Fractie I/III bevat een aantal niet-geïdentificeerde substanties in geringe hoeveelheden:

X₁ is BT-positief en Fl-negatief.

X₂ is BT-positief en meestal Fl-negatief.

X₃ is BT-negatief en Fl-positief.

De R_F -waarden in systeem Bush C zijn resp. 0,8; 1,1; 1,25.

In gevallen van pathologische en iatrogene hyperfunctie van de bijnierschors zijn nog enkele andere substanties in deze fractie waargenomen. Deze zijn in de tabel aangeduid als X_a, X_b en X_c.

X_a is BT-positief en Fl-positief.

X_b is BT-positief en Fl-positief.

X_c is BT-positief en Fl-positief.

De R_F -waarden in systeem Bush C zijn resp. 1,0; 1,5; 2,0.

Fractie I/IV bevat zonder uitzondering twee geïdentificeerde steroiden:

1. E: BT-positief, Fl-positief en DNPH-positief. Fluorescentie in 70% fosforzuur blauw. De R_F -waarde in de systemen propyleenglycol/tolueen, Bush C, Bush B₁ en formamide/chloroform is gelijk aan die van authentiek E.

2. H₄S: BT-positief, Fl-negatief. De R_F -waarde in de systemen propyleenglycol/tolueen, Bush C, Bush B₁ en formamide/chloroform is gelijk aan die van authentiek H₄S.

Bovendien kan aldosteron als een BT-positief, Fl-positief vlekje met een R_{FE} van 0,65 in systeem Bush C, in deze fractie worden aangetoond, indien de excretie ervan verhoogd is.

Een vierde substantie, aangeduid als X_4 en vrijwel altijd aanwezig, vertoont een BT-positieve reactie, waarbij de kleur via blauw verandert in grijsgroen; de natronloog-fluorescentie is lichtblauw. De Rf_E in systeem Bush C is $\pm 0,6$.

Fractie II/I bevat het geïdentificeerde steroid H_4B : BT-positief, Fl-negatief. De Rf -waarde in de systemen propyleenglycol/tolueen, Bush C, Bush B_1 , formamide/chloroform en formamide/benzeen is gelijk aan die van authentiek H_4B .

Op de twee chromatogrammen die voor de isolering worden gebruikt (systeem propyleenglycol/tolueen en systeem Bush B_1) werd polair van H_4B herhaaldelijk een BT-positieve, Fl-positieve substantie gezien, die zeker niet altijd mag worden beschouwd als "overgelopen" E. De substantie is Y_1 genoemd en heeft in systeem Bush B_1 een Rf_{H_4B} van $\pm 0,3 - 0,5$.

Vaak is in deze fractie nog een BT-positieve, Fl-negatieve substantie aanwezig met een Rf_{H_4B} van $1,4$; de substantie is in de tabel aangegeven als Y_a .

Fractie II/II bevat een BT-positieve, Fl-negatieve substantie met een Rf_B van resp. $0,45$; $0,85$ en $0,85$ in de systemen propyleenglycol/tolueen, Bush B_1 en formamide/benzeen. Deze chemische en fysische eigenschappen, gecombineerd met gegevens uit de literatuur, maken het zeer waarschijnlijk dat de substantie allo- H_4B is. Omdat authentiek allo- H_4B niet ter beschikking was, konden identificatie-proeven niet worden uitgevoerd; de naam in de tabellen en diagrammen is dan ook tussen aanhalingstekens geplaatst.

Fractie II/III bevat het geïdentificeerde steroid H_4A : BT-positief en Fl-negatief. De Rf -waarde in de systemen propyleenglycol/tolueen, Bush B_1 en formamide/benzeen is gelijk aan die van authentiek H_4A .

Soms zijn in deze fractie kleine hoeveelheden van een substantie Y_2 aanwezig: BT-positief, Fl-negatief; de Rf_{H_4A} in systeem Bush B_1 is $1,4$. Het lijkt onwaarschijnlijk dat de substantie in alle gevallen allo- H_4A zou zijn.

In deze fractie moet ook S worden gezocht, aangezien dit steroid in het propyleenglycol/tolueen systeem vrijwel dezelfde Rf -waarde heeft als H_4A . De Rf_{H_4A} van S in systeem Bush B_1 is $\pm 1,3$. Zoals op grond van gegevens uit de literatuur kon worden verwacht, werd S slechts in enkele gevallen door ons aangetoond en geïdentificeerd. Bij de bespreking van deze gevallen zal hierop nader worden ingegaan.

Fractie II/IV bevat in het algemeen vijf BT-positieve substanties, waarvan slechts één fluoresceert. Deze BT-positieve, tevens Fl-positieve substantie is geïdentificeerd als B. De Rf -waarde in de systemen propyleenglycol/tolueen, Bush B_1 en formamide/benzeen is gelijk aan die van authentiek B.

Van de vier niet-geïdentificeerde BT-positieve, Fl-negatieve

substanties volgen hieronder de letter-aanduidingen en de Rf_B in systeem Bush B_1 :

$Y_3: \pm 0,75$

$Y_4: \pm 1,3$

$Y_5: \pm 1,6$

$Y_6: \pm 2,3$

Na stimulatie van de bijniere met ACTH blijkt alleen Y_6 onmiskenbaar in hoeveelheid toe te nemen, zodat een verband van deze substantie met de bijnierschors waarschijnlijk is.

Stadium III bevat meestal één fractie (fractie III/II), waarin meestal drie BT-positieve substanties voorkomen.

Een hiervan fluoresceert en dit BT-positieve, Fl-positieve steroïd is geïdentificeerd als A. De Rf -waarde in de systemen propyleenglycol/tolueen, Bush B_1 en formamide/benzeen is gelijk aan die van authentiek A.

De twee BT-positieve, Fl-negatieve substanties Z_1 en Z_2 hebben in het systeem Bush B_1 een Rf_A van resp. 0,6 en 2,0. Z_2 is in gevallen van iatrogene of pathologische bijnierhyperfunctie vaak in duidelijk toegenomen hoeveelheden aanwezig, zodat een relatie met de bijnierschors mogelijk is.

In deze gevallen van bijnierhyperfunctie bevat stadium III vaak nog een tweede BT-positieve, Fl-positieve fractie, polair van de A-fractie gelegen en fractie III/I genoemd. Bij de rechromatografie in systeem Bush B_1 blijkt hierin een BT-positieve, Fl-positieve substantie voor te komen met een Rf_A van 0,7; soms ook nog een BT-positieve, Fl-negatieve substantie met een Rf_A van 1,6. Deze substanties zijn in de tabel aangegeven als resp. Z_a en Z_b .

In enkele uitzonderlijke gevallen werd in stadium III een BT-positieve, Fl-positieve fractie ter hoogte van het referentiesteroïd DOC aangetoond; deze fractie is in de tabel aangegeven als fractie III/III.

Samenvattend kan worden gesteld dat in totaal tien corticosteroiden uit urine zijn geïsoleerd en geïdentificeerd nl.:

H_4F , H_4E , F, E, H_4S , H_4B , H_4A , B, A en aldosteron.

Bovendien werden drie corticosteroiden met grote waarschijnlijkheid aangetoond, nl. allo- H_4F , allo- H_4B en Reichstein's U. Voor alle steroïden geldt dat de identificatie niet voldoet aan de hoogste eisen die hieraan kunnen worden gesteld. Toch zijn wij van mening dat er nauwelijks twijfel kan bestaan ten aanzien van de identiteit der met name genoemde steroïden.

Deze mening is gebaseerd op:

1. gegevens uit de literatuur.

Alle betrokken steroïden zijn door andere onderzoekers in vergelijkbare hoeveelheden uit urine geïsoleerd en met absolute zekerheid geïdentificeerd.

2. chemische eigenschappen van de geïsoleerde steroiden: BT-reactie, natronloog-fluorescentie, DNPH-reactie, fosforzuur-fluorescentie.
 3. fysische eigenschappen van de geïsoleerde steroiden. Alle steroiden uit de groep van tien hebben dezelfde Rf-waarden als de resp. authentieke referentie-steroiden in drie of meer uiteenlopende systemen. Van allo-H₄F, allo-H₄B en Reichstein's U was deze directe vergelijking niet mogelijk. De relatieve Rf-waarden ten opzichte van referentie-steroiden in tenminste drie systemen zijn evenwel overeenkomstig de opgaven in de literatuur.
 4. stijging resp. daling van de concentraties in gevallen van iatrogene of pathologische hyper-resp. hypo-functie van de bijnierschors.
 5. de resultaten van recovery-proeven (par. C₁).
- In enkele bijzondere gevallen werden S, DOC en waarschijnlijk H₄DOC geïsoleerd; bij de bespreking van deze gevallen zal op de identificatie nader worden ingegaan.

C. Overzicht van de kwantitatieve analyse.

1. Recovery-proeven.

In tabel II zijn de resultaten samengevat van een aantal bepalingen, waarbij getracht is om aan urine toegevoegde referentie-steroiden terug te winnen.

Aan een van twee identieke porties urine (1/5 van de 24 uren urine) werden authentieke corticosteroiden toegevoegd in

TABEL II

RECOVERY				
	δ/24uur (Present)	Toegevoegd (Added)	Teruggevonden (Recovered)	Recovery percentage
H ₄ F	640	50 δ	48 δ	95%
H ₄ E	2560	1000 δ 125 δ	980 δ 128 δ	98% 100%
F	75	50 δ 10 δ	33 δ 8 δ	70% 80%
E	120	15 δ	12 δ	80%
H ₄ S	80	10 δ	8 δ	80%
H ₄ B	160	50 δ 15 δ	52 δ 10 δ	100% 70%
H ₄ A	160	15 δ	12 δ	80%
B	10	25 δ 10 δ	23,5 δ 7 δ	90% 70%
A	sp.	25 δ	20 δ	80%

nauwkeurig gedoseerde hoeveelheden. Beide urines werden op de gebruikelijke wijze bewerkt en na aftrek van de natuurlijk voorkomende steroiden kon het percentage van de toegevoegde steroiden, dat werd teruggewonnen, worden berekend.

Het gemiddelde recovery-percentages bedraagt 80 %, zodat dus ongeveer 20 % van de toegevoegde steroiden verloren is gegaan. Naar analogie mag worden aangenomen dat ook van de natuurlijke urine-steroiden tijdens de hele procedure ongeveer 20 % verloren gaat.

Dit is in overeenstemming met de bevindingen van anderen: van toegevoegd H_4E vond Romanoff 80 % terug, Kinsella 73 - 84 %, Gold 98 %;

van toegevoegd H_4F vond Romanoff 80 % terug en Gold 86 %; van toegevoegd F vond Cope 70 ± 9 % terug en Gold 100 %.

De uitkomsten van onze bepalingen zijn opgegeven zonder dat er een correctie is aangebracht voor dit verlies van 20 % dat inherent is aan de methodiek.

De resultaten van de recovery-proeven illustreren de betrouwbaarheid van de methode en vormen een belangrijke aanwijzing dat de geïsoleerde urine-steroiden en de toegevoegde referentie-steroiden identiek zijn.

2. Indeling van de resultaten.

Het complete resultaat van onze onderzoeken is neergelegd in de overzichtstabel.

Het gemiddelde van de hierin vermelde uitkomsten van de duplo-bepalingen is weergegeven in de tabellen IV t/m XII, waarin de belangrijkste gegevens nog eens zijn samengevat.

Indeze samenvattende tabellen zijn in de aldosteron-kolom de uitkomsten van de methode van Neher en Wettstein vermeld.

De diverse verhoudingen (ratio's) zijn hierin opgenomen met de bedoeling om eventuele verschuivingen in de excretie van bepaalde individuele steroiden of groepen steroiden ten opzichte van andere individuen of groepen tot uitdrukking te brengen. In gevallen waarin de excreties van de steroiden, ieder voor zich, nog binnen de normale variatiebreedte liggen, kan nl. een duidelijke stijging of daling van een ratio aanleiding zijn om toch een verandering in de secretie van de bijnierschors aan te nemen.

De H_4F/H_4E -ratio en de F/E -ratio zijn van enig belang omdat een (snelle) endo-of exogene toename van F in de circulatie vaak duidelijker in de excretie van H_4F en F tot uiting komt dan in de excretie van H_4E en E ; de relatief sterke stijging van de H_4F - en F -excretie manifesteert zich dan in een hoge ratio.

De F/B -ratio is berekend uit de som van H_4F (+ allo- H_4F) + H_4E + E + F (F-groep) enerzijds en de som van H_4B + allo- H_4B + H_4A + A + B (B-groep) anderzijds. De mogelijke betekenis van deze ratio zal in par. J van dit hoofdstuk worden besproken.

Reichstein's U is bij de berekening van de F/B-ratio bewust uit de groep F-metabolieten weggelaten omdat er in de groep B-metabolieten geen gelijksoortig steroid tegenover staat. Bij de berekening van totaal F wordt Reichstein's U wel meegerekend. Totaal F vermeerderd met de S-groep (H_4S + S) vormt het totaal der individueel bepaalde 17-hydroxy-steroiden. In par. C₃ zal dit totaal worden vergeleken met de totale 17-hydroxy-steroiden die als groep met de reactie van Appleby-Norymberski in dezelfde 24 uren urine zijn bepaald.

De betekenis van de verhouding van de S-groep en de F-groep wordt in par. K besproken; daar zal worden uiteengezet waarom de F/S-relatie is weergegeven in de vorm van "percentage gediffundeerd S".

De spectra zullen worden besproken in vergelijking met de klinische toestand van de onderzochte personen.

Deze zijn als volgt ingedeeld:

- normale controle-personen (par. D);
- patienten zonder bijnierschorsafwijkingen (par. E);
- neonati zonder bijnierschorsafwijkingen (par. F);
- patienten met een hypofunctie van de bijnierschors (par. G);
 1. primaire bijnierinsufficiëntie: M. Addison;
 2. secundaire bijnierinsufficiëntie: panhypopituitarisme;
- patienten met een pathologische hyperfunctie van de bijnierschors (par. H);
 1. syndroom van Cushing;
 2. adrenogenitaal syndroom;
 3. syndroom van Conn;
- patienten met een geïnduceerde hyperfunctie van de bijnierschors (par. I);
 1. stimulatie met exogeen ACTH;
 2. stimulatie met endogeen ACTH, via blokkering van de F-synthese door SU-4885.

De ziektebeelden zijn om praktische redenen zeer beknopt weergegeven; alleen als er enige aanleiding bestaat om aan de juistheid van een diagnose te twifelen, is een wat uitvoeriger ziektegeschiedenis opgenomen.

De volgende gegevens werden voor een vergelijking met de spectra voldoende geacht:

- a. enkele punten uit de anamnese die aanwijzingen bevatten omtrent de aetiologie en de duur van het ziektebeeld.
- b. de klinische diagnose, vaak aangevuld met enkele symptomen waaruit de ernst van de toestand kan blijken of waarmee een nadere typering van een syndroom kan worden gegeven.

c. de uitkomst van de groepsbepaling der 17-hydroxy-steroiden en 17-oxo (keto)-steroiden.

d. de eventuele anatomische diagnose.

Deklinische diagnoses werden gesteld door prof. dr. F. S. P. van Buchem en dr. H. Doorenbos (Kliniek voor Inwendige Geneeskunde); dr. L. Meyler, internist te Groningen; prof. dr. J. H. P. Jonxis (Kliniek voor Kindergeneeskunde); J. J. Speelman, internist (Psychiatrische Inrichting Dennenoord, Zuidlaren); J. M. Coenegracht, internist-endocrinoloog te Maastricht; dr. A. Weeke, internist te Groningen; dr. K. C. van Beusekom, internist te Meppel; prof. dr. A. Querido (afdeling Stofwisselingsziekten en Endocrinologie, Academisch Ziekenhuis, Leiden).

De adrenalectomieën werden uitgevoerd door prof. dr. L. D. Eerland en F. R. van der Stadt (Kliniek voor Heelkunde) en dr. J. Julius, chirurg te Groningen.

Het anatomisch onderzoek werd verricht door prof. dr. A. Arends en E. Ebels (Pathologisch-Anatomisch Laboratorium).

De 17-oxo (keto)-steroiden en de totale 17-hydroxy-steroiden werden volgens de methode van Appleby-Norymberski bepaald in het Centraal Laboratorium van het Academisch Ziekenhuis (dr. A. Groen).

De bepaling van cortisol en corticosteron in plasma bij patiënte J. -A. werd verricht door W. Artz in het Organisch-Chemisch Laboratorium.

3. Vergelijking van de resultaten met de uitkomsten van de routine steroidbepalingen in urine.

Op drie manieren is getracht onze resultaten te toetsen aan gegevens, die op andere wijze werden verkregen.

a. door de correlatie na te gaan van de spectra met het klinische beeld.

Bij de gedetailleerde bespreking van de spectra in de paragrafen D t/m I zal blijken dat deze correlatie zeer bevredigend is.

b. door een vergelijking met laboratoriumgegevens die door anderen volgens het principe van de individuele steroidbepalingen zijn verzameld.

Bij de bespreking van de spectra zijn daartoe de resultaten van andere onderzoekers in overeenkomstige gevallen vermeld.

De vergelijking heeft slechts beperkte waarde. In de eerste plaats zijn de gegevens schaars, zeer speciaal wat betreft de B-groep, en in de tweede plaats is geen enkele methode voldoende vergelijkbaar met onze methodiek om als toetssteen te kunnen dienen. De bepaling met de grootste over-

eenkomst is de methode van Baulieu en Jayle, die eveneens twee chromatografische scheidingen uitvoeren en hetzelfde principe gebruiken voor de kwantitatieve bepaling. Hun uitkomsten zijn vrijwel gelijk aan de onze.

c. door een vergelijking met de excretie van de totale 17-hydroxy-steroiden, als groep bepaald met de methode van Appleby-Norymberski.

In tabel III zijn naast elkaar gesteld de som van de individueel bepaalde 17-hydroxy-steroiden en de als groep bepaalde 17-hydroxy-steroiden en 17-oxo-steroiden, uitgedrukt in $\mu\text{g}/24$ uur.

In alle gevallen zijn de bepalingen verricht in dezelfde 24 uurs urine. De som van de individueel bepaalde 17-hydroxy-steroiden omvat de totale F-groep ($\text{H}_4\text{F} + \text{H}_4\text{E} + \text{F} + \text{E} + \text{U} + \text{allo-H}_4\text{F}$) + de S-groep ($\text{H}_4\text{S} + \text{S}$).

TABEL III - TABLE III

Nº	Patient	Totaal individueel bepaalde 17-OH-steroiden $\mu\text{g}/24$ uur (F-groep + S-groep)	Als groep bepaalde 17-OH-steroiden $\mu\text{g}/24$ uur (Total 17-OH-steroids)	Als groep bepaalde 17-oxo-steroiden $\mu\text{g}/24$ uur (17-Ketosteroids)	Percentage
9	S.	4010	2500	10300	160
10	W.-W.	3650	10800	11900	34
13	D.	2485	8900	7100	28
14	W.	5880	20000	37300	29
14 ^a	"	4740	16500	12200	29
27	M.	16600	49300	28800	34
30	M.-F.	2035	28200	35200	7
31	Sche.	2495	28500	47700	9
32	v.T.	5900	99600	245800	6
38	L.-D.	2645	6600	9700	40
8	S.-D.	1920	7300	6300	26
8 ^a	" ACTH	8460	20000	11300	42
8 ^b	" ACTH	19880	22600	19600	88
20	L.	2110	6900	9700	32
20 ^a	"	2700	8000	15200	34
20 ^b	" ACTH	2340	7300	14800	32
20 ^c	" ACTH	1820	7100	10400	26
23	R.	760	2700	5700	28
23 ^a	" ACTH	1900	5900	8200	32
23 ^b	" ACTH	3800	8400	11200	45
23 ^c	" SU-4885	1160	6800	13500	17
28	v.d.H.	5100	11400	17100	45
28 ^a	" ACTH	21220	11100	61800	190
28 ^b	" ACTH	21100	20500	72300	103
34 ^a	M.-U. ACTH	10110	38800	12900	26
40	E. SU-4885	12180	18600	18600	65
40 ^b	" "basaal" ("basal")	4460	12700	6700	35

De B-groep blijft geheel buiten beschouwing, omdat deze steroiden geen 17-hydroxy-groep bezitten en dus niet met de groepsbepalingen worden gemeten. De hoeveelheid individueel bepaalde 17-hydroxy-steroiden, uitgedrukt als percentage van de als groep bepaalde 17-hydroxy-steroiden, is aangegeven in de laatste kolom van de tabel.

Bij de beoordeling van deze percentages valt het volgende op:

- a. in twee gevallen (160% bij patiënte S. en 190% bij patiënt v.d.H., 1e dag ACTH) ligt het percentage aanzienlijk boven de 100.

Ergens moet dus een fout zijn gemaakt.

- b. over het algemeen ligt het percentage bij gemiddelde en lage steroid-excreties tussen de 25 en 40 (gemiddeld ± 30). Deze discrepantie, die ook blijft bestaan als de excretie van de individuele steroiden wordt gecorrigeerd voor het verlies van 20% dat inherent is aan de methodiek, was te verwachten.

In de als groep bepaalde 17-hydroxy-steroiden zijn nl. enkele F-metaboliëten inbegrepen die niet met de spectrum-bepaling kunnen worden gemeten, zoals de hoogpolaire steroiden cortol, cortolon, β -cortol, β -cortolon en Reichstein's E. Wanneer deze steroiden inderdaad $\pm 30\%$ van de F-metaboliëten uitmaken, zoals door Fukushima (1955) is aangegeven, is hiermee een groot deel van het verschil verklaard.

Een ander deel komt vrij zeker voor rekening van a-specifiek reagerend materiaal dat met de groepsbepaling wordt meebepaald. Met de spectrum-bepaling wordt dus beslist te weinig bepaald en met de groepsbepaling waarschijnlijk te veel. De hoeveelheid 17-hydroxy-steroiden die in werkelijkheid wordt uitgescheiden, zal waarschijnlijk liggen tussen de uitkomsten van de twee bepalingen. Zowel Baulieu als Vermeulen (1957) hebben de excretie van de individueel bepaalde steroiden $H_4F + H_4E + F + E$ vergeleken met de excretie van de als groep bepaalde 17, 21-dihydroxy-20-oxo-steroiden (Porter-Silber-chromogenen) en kwamen beide op een percentage van 30-50. Ondanks het feit dat de hoogpolaire F-metaboliëten niet zijn inbegrepen bij de Porter-Silber-chromogenen, zijn dus ook bij deze onderzoeken aanzienlijke verschillen gevonden.

- c. naarmate de excretie van steroiden toeneemt onder invloed van ACTH komen de uitkomsten van beide bepalingen dichter bij elkaar te liggen.

In twee gevallen (S. -D. en v.d.H.) met de hoogste waarden, wordt zelfs een percentage van resp. 88 en 103 bereikt. Ook dit schijnt te wijzen op de storende invloed van

a-specifieke chromogenen bij de groepsbepaling want dit convergeren is juist wat men zou verwachten, als deze chromogenen inderdaad een belangrijke oorzaak zouden zijn van de discongruentie bij lagere steroid-excretie: hun invloed op de uitkomst van de groepsbepaling zal nl. relatief kleiner worden naarmate meer specifiek reagerende steroiden aanwezig zijn.

Uit het convergeren van de uitkomsten van de twee bepalingen kan ook nog worden afgeleid dat er bij toenemende productie van F geen verschuiving van het F-metabolisme in de richting van de hoogpolaire 20-hydroxymetabolieten optreedt. Deze conclusie is van belang voor de interpretatie van de F/B-ratio (par. J).

- d. de zeer lage percentages van 9 bij patiënte Sche. en van 7 bij patiënte M.-F. zijn in overeenstemming met de opvatting dat in gevallen van viriliserende hyperplasie (adrenogenitaal syndroom) een abnormaal groot gedeelte van de als groep bepaalde 17-hydroxy-steroiden voor rekening komt van derivaten van 17-hydroxy-progesteron. De hoeveelheid van deze groep 21-desoxy-steroiden kan dus via de percentage-berekening indirect worden bepaald, waardoor de berekening diagnostische waarde krijgt.

Onze voorlopige indruk is dat ernstig rekening moet worden gehouden met een viriliserende hyperplasie, indien van de als groep bepaalde 17-hydroxy-steroiden minder dan 10 % voor rekening komt van de totale F-groep + S-groep; een viriliserende hyperplasie is onwaarschijnlijk wanneer dit percentage ongeveer 30 bedraagt.

Wij hebben deze theorie onlangs aan de praktijk getoetst in het geval van patiënte W. (par. E). Op grond van een percentage van 29 werd een viriliserende hyperplasie zeer onwaarschijnlijk geacht; de uitslag van de steroidbepalingen na gonadectomie, die niet de bijniëren maar de gonaden aanwijst als bron van de overmaat 17-oxo-steroiden, schijnt deze uitspraak te ondersteunen.

Binnenkort hopen wij in staat te zijn pregnaantriol en pregnaantriolon met de beschreven methodiek individueel te bepalen, waardoor de productie van 17-hydroxy-progesteron op meer directe wijze kan worden benaderd.

4. Interpretatie van de spectra.

Kwantitatieve corticosteroidbepalingen, zowel in bloed als urine, worden uitgevoerd met de bedoeling om een indruk te krijgen van de functietoestand van de bijniërschors, met als uiteindelijk ideaal het vaststellen van de dagproductie

van alle hormonen. Het is verleidelijk om te trachten deze dagproducties te berekenen op basis van de gecorrigeerde excretie van individuele corticosteroiden in urine (Romani, 1959).

Hierbij stuit men echter op de volgende moeilijkheden (Cope, 1959):

- a. het percentage van het geproduceerde F dat (bij normale stofwisseling) als zodanig in de urine terecht komt, vertoont de grote spreiding van 0,15 - 2 %, waardoor een betrouwbare productie-berekening onmogelijk is. Deze spreiding hangt samen met een relatief sterke stijging van de niet aan eiwit gebonden hoeveelheid plasma-F bij toenemende productie, waardoor bijv. een 5-voudige stijging van de totale hoeveelheid plasma-F gepaard gaat met een 12 a 25-voudige stijging van de hoeveelheid filterbaar plasma-F.

Hiermee in overeenstemming is onze waarneming bij patiënte J. -A. met bijniercarcinoom, dat een 6 à 7-voudige stijging van het plasma-F gecorreleerd was met een 40-voudige stijging van het urine-F.

- b. het percentage van het geproduceerde F dat in de vorm van $H_4 F + H_4 E$ wordt uitgescheiden bedraagt bij normale stofwisseling $\pm 20\%$.

Ook dit percentage kan aanzienlijk wisselen en bij toenemende productie dalen tot bijv. 5 %, omdat een steeds groter gedeelte van de geproduceerde hoeveelheid als onveranderd F in de urine terecht komt.

- c. bij gestoorde stofwisseling (levercirrhose, neonati, myxoedeem) is het percentage van het geproduceerde F dat als zodanig of in de vorm van metaboliëten wordt uitgescheiden, uiteraard volkomen onberekenbaar.

Op grond van deze overwegingen hebben wij geen poging gedaan de dagproductie van de bijnierschors hormonen door omrekening af te leiden uit de excretie van een of meer corticosteroiden. Voorlopig zal de functietoestand van de bijnierschors met reserve uit het totale spectrum worden afgelezen met inachtneming van het klinische beeld en de talrijke factoren die de activiteit van de bijnierschors kunnen beïnvloeden. In verband hiermee zijn geslacht, leeftijd en ciurese van de onderzochte personen altijd opgegeven; tenzij anders vermeld, werd de urine van de patienten verzameld tijdens volledige bedrust.

TABEL IV - Normale controle-personen - TABLE IV - Normal individuals

N ^o Case	Naam Name	H ₄ F	H ₄ E	"allo- H ₄ F"	"U"	E	F	H ₄ S	S	H ₄ B	"allo- H ₄ B"	H ₄ A	A	B	Ald.	H ₄ F/H ₄ E	F/E	Totaal F	Totaal B	F/B	% gediff.S
1	C.-K.	900	2240	-	25	135	80	50	-	360	330	160	15	30	-	0,4	0,6	3380	895	3,7	1,5
1 ^a	"	360	1280	-	10	35	40	30	-	120	220	75	5	5	-	0,3	1,0	1725	425	4,0	1,7
2 ^a	C.	800	2800	-	40	80	55	60	-	200	300	180	20	20	-	0,3	0,7	3775	720	5,2	1,6
3	Bo.	1200	2800	-	20	100	80	60	-	360	260	180	20	40	-	0,4	0,8	4200	860	4,9	1,4
4	Scho.	850	2450	-	20	90	90	60	-	180	110	120	20	35	-	0,3	1,0	3500	465	7,5	1,7
5	Fij.	800	2200	-	35	70	60	65	-	190	190	130	-	10	-	0,4	0,9	3165	520	6,0	2,0
6	V.	640	2560	440	40	120	70	80	-	160	360	160	10	10	-	0,3	0,6	3870	700	5,4	2,0

D. Het spectrum van normale controle-personen.

Overzichtstabel; tabel IV; diagram 1 en 2.

Deze groep omvat een vrouw en vijf mannen van vrijwel dezelfde leeftijd. De urine werd verzameld op dagen met normale routine-activiteit.

Van twee personen (C. en C.-K.) werd de urine op twee verschillende dagen onderzocht. In één geval (spectrum 2^{a-b}) werden in dezelfde 24 uurs urine twee bepalingen verricht, ten einde de invloed na te gaan van een klein verschil in de procedure (hydrolyse bij resp. pH 1,0 en pH 4,8).

De groep is zeer klein en zeer eenzijdig geselecteerd naar leeftijden en geslacht. Dit is een gevolg van praktische omstandigheden: de gebruikte techniek is zo arbeidsintensief en tijdrovend dat het onmogelijk is om binnen redelijke tijd materiaal te verzamelen dat representatief is voor de hele populatie; de samenstelling van de groep is onbewust tot stand gekomen bij een poging om ons zo snel mogelijk te oriënteren over de steroidhoeveelheden in gemakkelijk te verkrijgen urines (van mannelijke collegae en medewerkers). Noodgedwongen zullen de bij deze groep verkregen resultaten, aangevuld met enkele gegevens van patienten zonder bijnierschorsafwijkingen, moeten dienen als vergelijkingsmateriaal voor de andere groepen. Bij deze vergelijkingen moet men bedenken dat de steroidsecretie en -excretie door talrijke factoren worden beïnvloed: leeftijd, geslacht (graviditeit, menstruele cyclus?), activiteit, allerlei vormen van "stress", diurese etc.

Uit de tabellen blijkt dat alle geïdentificeerde corticosteroiden in alle urines aanwezig zijn, zij het in soms nauwelijks aantoonbare hoeveelheden (B en A).

Enkele algemene conclusies zijn uit het overzicht te trekken:

1. uit de duplo-bepalingen blijkt dat deze over het algemeen niet meer dan 20% uiteenlopen.

Deze foutenmarge in de bepaling stoort de beoordeling van de spectra niet ernstig, aangezien de normale spreiding van alle bepaalde steroiden van individu tot individu en voor hetzelfde individu onder verschillende omstandigheden, van minstens dezelfde orde is. Deze spreiding is zelfs binnen de homogene groep mannen nog ongeveer + 50%. Naarmate de groep gevarieerder wordt naar leeftijd en geslacht, zal deze spreiding zeker nog groter worden.

2. de twee spectra van urine C., op verschillende dagen verzameld (spectrum 2 en spectrum 2^a, tonen een opvallend overeenkomstig patroon.

De twee spectra van urine C.-K., op verschillende dagen verzameld (spectrum 1 en spectrum 1^a, tonen daarentegen een opvallend groot verschil. Ter verklaring van de betrekkelijk geringe steroid-excretie in de urine van sept. 1959 komen verschillende factoren in aanmerking:

TABEL IV^a

Excretie van de F-groep ($\mu\text{g}/24$ uur) bij
normale personen en patiënten zonder bijnierschorsafwijkingen
Literatuur - overzicht

	H ₄ F	H ₄ E	allo-H ₄ F	E	F	H ₄ F/H ₄ E
De Courcy c.s.	212 ± 53	1564 ± 26	-	91,5 ± 18 (♂) 84 ± 6,3 (♀ . postmens.) 43 ± 4 (♀, praemens.)	34,5 ± 7 (♂) 33 ± 6,5 (♀, postmens.) 105 ± 56 (♀, praemens.)	-
Kinsella en Glick	-	2000 - 3900 (bij 1 v.d. 6 p.p. 5100 - 7400)	-	100 - 200	100 - 200	-
Cope en Hurlock	465 (220-1200)	1600 (840-2870) In latere publica- tie (1959): 1000-4000	-	150 (20-400)	98 (41 - 212) In latere publi- catie (1959): sp. - 100	-
Richardson c.s.	1100 - 1500 (H ₄ F + H ₄ E)		-	80 - 140	60-70	-
Romani	604-1521	1207-3770	-	58 - 195	110 - 936	-
Gold c. s.	2100 - 5400 (+ allo-H ₄ F)	2400-7400	-	-	-	-
Bush en Willoughby	1100 - 4800	1000-10400	0-2800	-	-	-
Baulieu en Jayle	160 - 1000	500-4000	-	-	20 - 100	0,3
Romanoff	1000 (400-2100)	3000 (1300-6600)	-	-	-	0,3-0,5
Eigen methode	800 (360-1200)	2400 (960-4160)	300 (80-450)	100 (40-160)	70 (40-100)	0,4

- a. de urine werd verzameld op een zeer warme dag en was dienovereenkomstig sterk geconcentreerd. Aangezien het enzympraeparaat werd toegevoegd op basis van 400 E/1.11 urine, bestaat de mogelijkheid dat deze hoeveelheid ten opzichte van het te splitsen materiaal te gering is geweest.
 - b. de geringe diuresis heeft mogelijk een ongunstige invloed gehad op de excretie van steroiden (A.F. Müller persoonlijke mededeling).
 - c. een derde mogelijkheid is een invloed van de menstruele cyclus, zoals de Courcy heeft aangetoond: zij vond in de praemenstruele week een hogere uitscheiding van F dan in de drie weken postmenstrueel; merkwaaardigerwijze was het omgekeerde het geval met de excretie van E.
3. de twee bepalingen in urine C. (spectrum 2^{a-b}) werden uitgevoerd met de bedoeling om het effect van de aanvullende hydrolyse bij pH 1,0 na te gaan.
- Uit de vrijwel identieke uitkomsten blijkt dat de lage pH, noodzakelijk om bijv. aldosteron te kunnen meebepalen, geen nadelige invloed op de steroiden heeft gehad. Het eventuele voordeel van de hydrolyse bij pH 1,0 komt in dit normale geval niet tot uiting.
- De uitkomsten zijn een illustratie geworden van de reproduceerbaarheid van de bepaling.

De gevonden waarden zullen worden besproken in vergelijking met overeenkomstige gegevens uit de literatuur.

1. H_4F , H_4E , allo- H_4F , F en E zijn ondergebracht in tabel IV^a.
Uit deze tabel blijkt o. a. dat de door ons gevonden waarden voor H_4F , H_4E en allo- H_4F aanzienlijk lager liggen dan bij Gold c. s. en Bush c. s. De oorzaak van deze opvallende discrepantie moet o. a. worden gezocht in het feit dat de methoden van deze onderzoekers uitsluitend zijn gericht op de bepaling van de hoogpolaire corticosteroiden en dan ook sterk afwijken van de door ons gebruikte methodiek.
De waarden van E, F en de verhouding H_4F/H_4E zijn over het algemeen in overeenstemming met waarnemingen van anderen.
2. Reichstein's U wordt onder voorbehoud vermeld, zowel wat betreft de identiteit als de kwantiteit. Gemiddelde waarde $30 \mu g/24$ uur, met een spreiding van $10-40 \mu g$. De Courcy vond bij normale mannen een gemiddelde excretie van $56 \pm 11,4 \mu g/24$ uur; bij vrouwen postmenstrueel $45 \pm 5,8 \mu g$ en praemenstrueel $187 \pm 68 \mu g$.

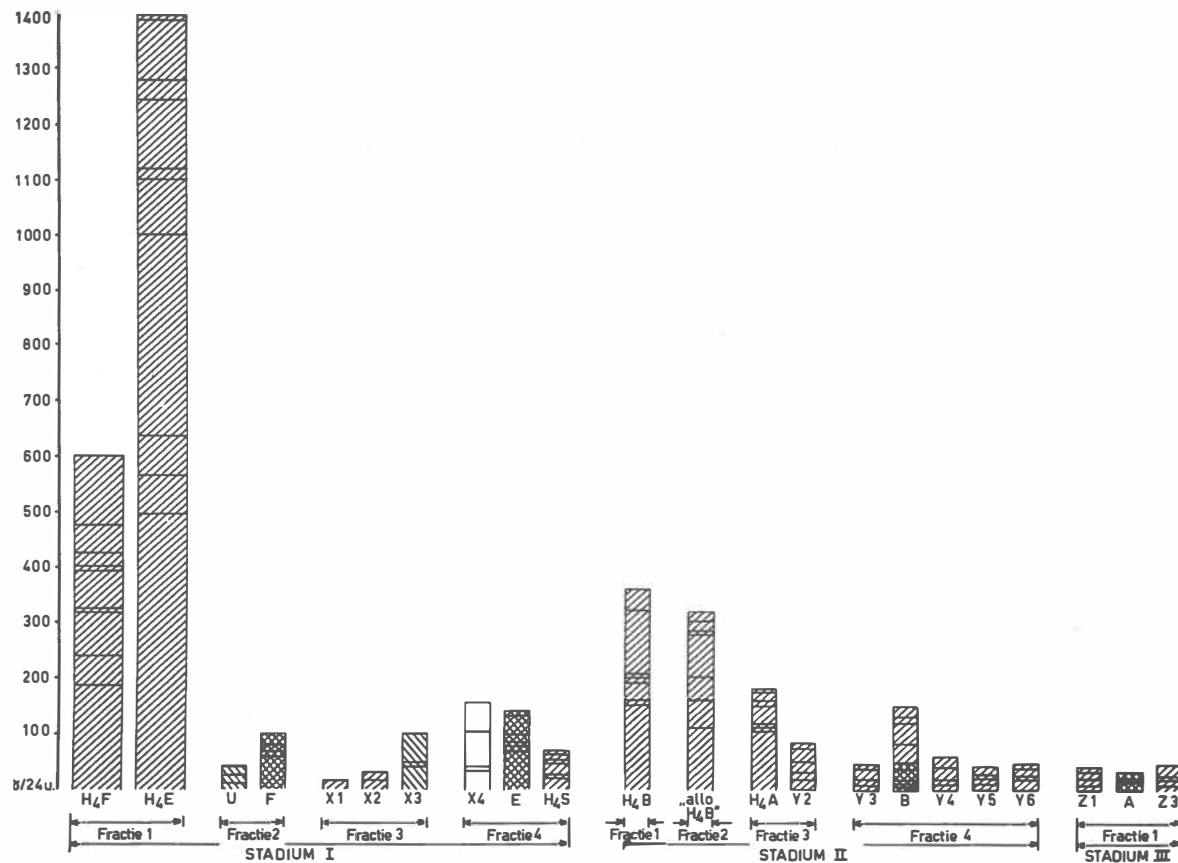


Diagram 1. Het complete spectrum van normale personen. In alle diagrammen heeft de arcering de volgende betekenis:

The complete pattern of normal individuals. In all diagrams the hatching means:



3. H_4S .

Gemiddelde excretie $60 \mu g/24$ uur, met een spreiding van $30-80 \mu g$. Richardson vond gemiddeld $20 \mu g/24$ uur.

4. de drie voornaamste tetrahydro-metabolieten van B werden in de volgende hoeveelheden geïsoleerd:

H_4B : $220 \mu g/24$ uur met een spreiding van $120-360 \mu g$.
allo- H_4B : $260 \mu g/24$ uur met een spreiding van $100-360 \mu g$.

H_4A : $150 \mu g/24$ uur met een spreiding van $70-220 \mu g$.

Romani bepaalde deze steroïden in hoeveelheden van resp. $0-390 \mu g/24$ uur; $58-195 \mu g/24$ uur; $123-338 \mu g/24$ uur.

Peterson (1960) vond bij twee personen resp. 120 en $270 \mu g/24$ uur; 300 en $300 \mu g/24$ uur; 60 en $160 \mu g/24$ uur.

Beide onderzoekers beschouwen allo- H_4B als de belangrijkste tetrahydro-metaboliët van B. Ook in ons materiaal komt dit tot uiting, al zijn er uitzonderingen op deze regel.

5. van B en A zijn in normale urines slechts met moeite micro-hoeveelheden aantoonbaar.

Dit hangt waarschijnlijk samen met de zeer snelle omzetting van B en zijn 11-dehydro-metaboliët tot tetrahydro-verbindingen. De moeilijkheden die bij de bepaling werden ondervonden, berusten op het feit dat beide steroïden zo laagpolair zijn. Dit houdt in dat bij een rigoreuze extract-zuivering grote verliezen zullen optreden en dat bij voorzichtige zuivering de B- en A-zones op de chromatogrammen besmet zijn met talrijke ballaststoffen uit de urine die de rechromatografie en de kwantitatieve bepaling storen.

Uit de overzichtstabel blijkt duidelijk dat het fluorescerende B als het ware schuilt in een massa BT-positief materiaal van onbekende aard. Wij hebben althans de discrepantie tussen de BT- en fluorescentie-reactie zo verklaard en zijn voorzichtigheidshalve alleen afgegaan op de fluorescentie-meting. Op deze basis werd voor B een normale gemiddelde waarde gevonden van $20 \mu g/24$ uur met een spreiding van $5-40 \mu g$, en voor A een normale waarde van $15 \mu g/24$ uur met een spreiding van $5-20 \mu g$.

De waarden die Romani heeft gepubliceerd zijn voor B: $17-169 \mu g/24$ uur en voor A: $0-65 \mu g/24$ uur. Peterson (1960) vond $2-5 \mu g/24$ uur.

Romani (1956) heeft aanvankelijk meegedeeld ook vrij grote hoeveelheden H_4DOC en DOC in normale urines te hebben gevonden, maar komt hier in latere publicaties niet meer op terug.

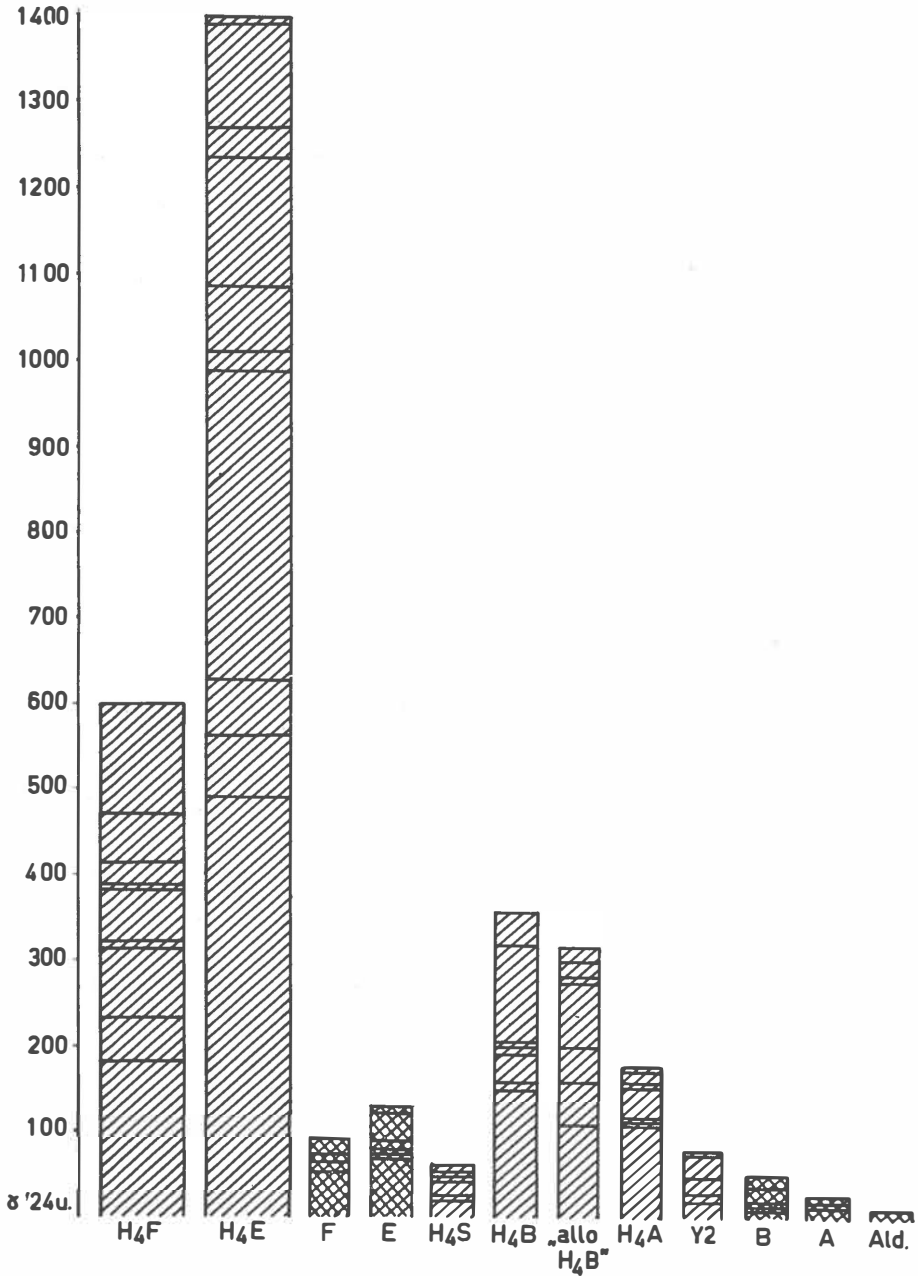


Diagram 2. De excretie van de voornaamste corticosteroiden ($\mu\text{g} = \gamma / 24$ uur) bij normale personen.
In alle volgende diagrammen is dit normale patroon ter vergelijking

The normal excretion pattern of the principal steroids ($\mu\text{g} = \gamma / 24$ hours). In the diagrams of patients this normal pattern is given for purposes of comparison.

Wanneer de besproken normaalwaarden worden aangevuld met gegevens, afkomstig van patienten bij wie een normale bijnierschorsfunctie met grote waarschijnlijkheid mag worden aangenomen, wordt de normale variatiebreedte groter dan in dit overzicht is aangegeven.

Uit de gecombineerde gegevens van de zes normale controlepersonen en zes patienten, besproken in par. E (W. -P., S. -D., S., K., W. -W. en W.) kan een "normaal spectrum" worden samengesteld, waarmee de spectra van de overige patienten zullen worden vergeleken ($\mu\text{g}/24$ uur):

H_4F	H_4E	allo- H_4F	F	E	H_4S	H_4B	allo- H_4B	H_4A	B	A	F/B	% gediff. S
100-	1000-	100-	40-	40-	20-	120-	80-	40-	5-	5-	4-	1-3
1200	4000	450	100	160	120	360	360	240	40	20	11	

De aldosteron-excretie bepaald volgens de methode van Neher en Wettstein is onder normale omstandigheden $1-10 \mu\text{g}/24$ uur.

E. Het spectrum van patienten zonder bijnierschorsafwijkingen.

Overzichtstabel; tabel V.

7. Patiente W. -P., 69 jaar.

Diagnose: lymphadenitis tuberculosa colli.

8. Patiente S. -D., 30 jaar.

Observatie naar aanleiding van een bij het Bevolkingsonderzoek op tuberculose gevonden afwijking op de thoraxfoto. Beide spectra tonen een laag-normale steroid-excretie, wat in verband met de inactiviteit wel verklaarbaar is.

9. Patiente S., 13 jaar; mobiel.

Observatie bijnierschorsafwijking in verband met een forse bouw, versterkte beharing en acne; ontwikkeling van mammae en genitalia externa normaal; geen adipositas.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden $2,5 \text{ mgr}/24$ uur, van 17-oxo-steroiden $10,3 \text{ mgr}/24$ uur.

10. Patiente W. -W., 29 jaar, mobiel.

Observatie M. Cushing in verband met adipositas; een rood, rond gezicht; striae; en een lichte diabetes mellitus.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden $10,8 \text{ mgr}/24$ uur, van 17-oxo-steroiden $11,9 \text{ mgr}/24$ uur.

De urine van beide patientes werd poliklinisch onderzocht. Op klinische gronden werd een bijnierschorsandoening onwaarschijnlijk geacht.

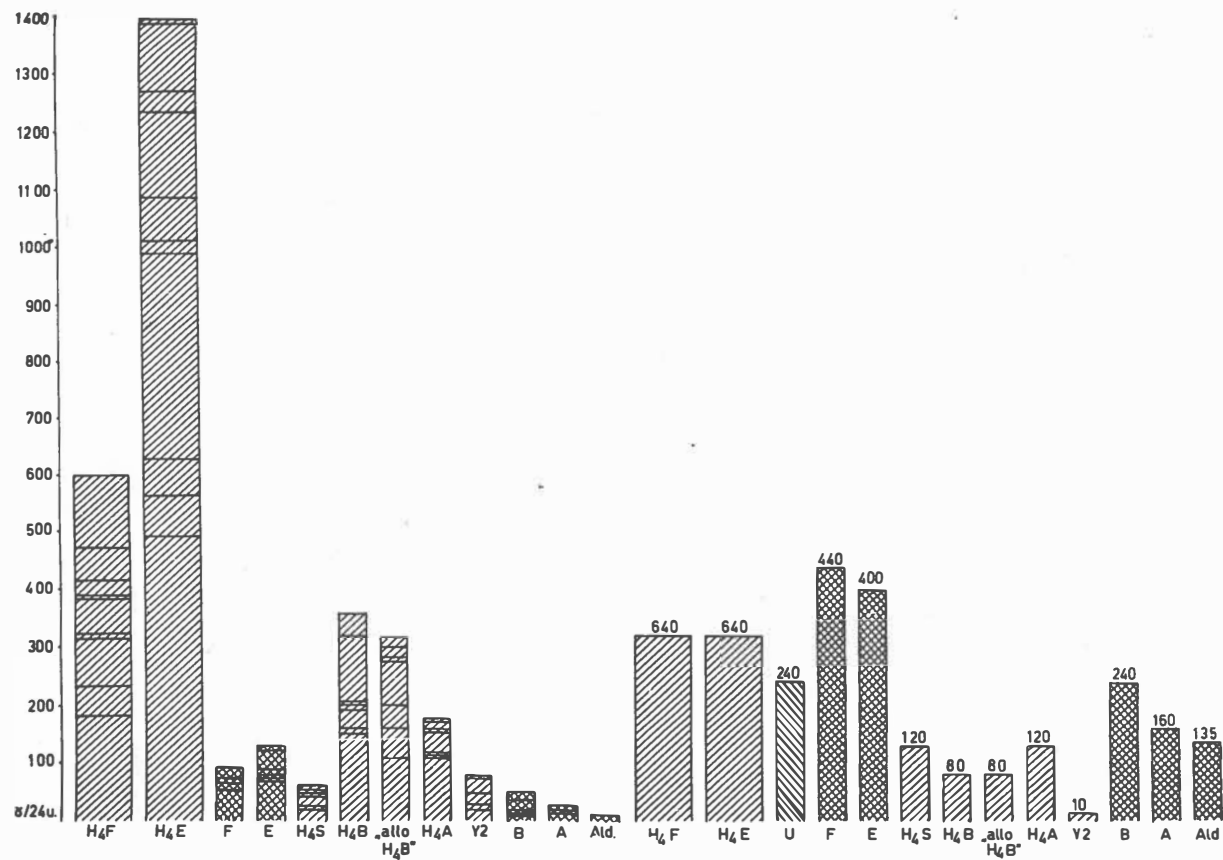


Diagram 3. Levercirrhose met ascites. (spectrum 13) Portal cirrhosis with ascites. (case 13)

Beide spectra tonen een normaal beeld.

11. Patient K., 52 jaar; mobiel.

Diagnose: ernstige arteriële circulatiestoornissen in het rechterbeen op bodem van arteriosclerose; oppervlakkig gangraen van de grote teen.

Patient kreeg dagelijks een intra-arteriële acetylcholine-injectie.

In het spectrum valt de hoge waarde van $H_4 E$ op met als gevolg een hoog totaal van de F-groepen een hoge F/B-ratio. Een samenhang van deze bevindingen met de "stress" van de aandoening en de therapie is niet uitgesloten.

12. Patient G., 23 jaar.

Diagnose: haemorrhagische diathese ten gevolge van een congenitale hypoprothrombinaemie.

Patiente werd opgenomen in verband met enkele kiesextracties. Het bloedverlies na de extracties op 1.3 en 6 maart was zodanig, dat er op 3 en 8 maart een bloedtransfusie moest worden gegeven.

Mogelijk verklaren deze feiten het afwijkende spectrum dat werd bepaald in de urine van 7 maart.

De verhoogde excretie van aldosteron mag worden beschouwd als een gevolg van het bloedverlies: vermindering van het bloedvolume is nl. een stimulans voor de aldosteronsecretie (vgl. Gross, 1959).

De toename in de excretie van alle steroïden van de B-groep, met als gevolg een duidelijke daling van de F/B-ratio, is opvallend. In par. J zal worden besproken hoe dit in verband gebracht kan worden met het secundaire hyperaldosteronisme.

13. Patient D., 16 jaar. Diagram 3.

Diagnose: zeer ernstige, gedecompenseerde levercirrhose, waarschijnlijk tengevolge van een deficiënte voeding.

Een snel recidiverende ascites moest worden behandeld met peritoneaalpuncties om de twee weken, waarbij telkens ± 10 l ascitesvocht werd verwijderd.

Het spectrum is zeer afwijkend en gekarakteriseerd door een sterk toegenomen excretie van de biologisch actieve corticosteroiden F, E, B, A en aldosteron enerzijds en een geringe excretie van de tetrahydro-metabolieten anderzijds. De verhouding $H_4 F + H_4 E / F + E$ bedraagt 1,5 (normaal ± 20) en de verhouding $H_4 B + \text{allo} - H_4 B + H_4 A / B + A$ is 0,7 (normaal ± 18).

Eenzelfde beeld, wat de F-groep betreft, werd beschreven door Vermeulen en Demeulenaere (1957); ook Johnson c.s. (1956) vonden een hoog gehalte aan biologisch actieve corticosteroiden in de urine van een patient met ernstige levercirrhose (308 μg F, 150 μg A en 215 μg S). Een verhoogde excretie van aldosteron bij levercirrhose is herhaaldelijk beschreven (vgl. Gross, 1959).

TABEL V. Patienten zonder bijnierschorsafwijkingen - TABLE V-Patients without adrenal cortical disease

No case	Naam Name	H ₄ F	H ₄ E	"allo- H ₄ F"	"U"	E	F	H ₄ S	S	H ₄ B	"allo- H ₄ B"	H ₄ A	A	B	Ald.	$\frac{H_4F}{H_4E}$	F/E	Totaal F	Totaal B	F/B	% gediff. S
7	W.-P.	480	1120	-	20	50	70	50	-	-	-	-	-	-	-	0,4	1,4	1740	-	-	2,8
8	S.-D.	640	960	140	10	90	55	20	-	125	160	40	5	20	4	0,7	0,6	1900	350	5,4	1,1
9	S.	800	2560	400	20	100	90	40	-	150	130	240	20	20	3	0,3	0,9	3970	560	7	1,0
10	W.-w.	1200	2000	80	40	140	90	100	-	240	80	160	30	40	8	0,6	0,6	3550	550	6,4	2,8
11	K.	1000	3850	-	15	85	75	50	-	125	105	220	10	70	-	0,3	0,9	5025	530	9,5	1,0
12	G.	720	2400	-	?	170	130	65	-	570	510	320	40	80	20	0,3	0,8	3420	1520	2,3	1,9
13	D.	640	640	-	240	400	440	125	-	80	80	120	160	240	135	1,0	1,1	2360	680	3,1	5,6
14	W.	880	4160	450	30	160	80	120	-	160	100	240	10	20	sp	0,2	0,5	5760	530	10,8	2,0
14 ^a	"	1280	3200	-	-	140	80	40	-	160	240	140	10	5	10	0,4	0,6	4700	555	8,5	1,0

TABEL VI-Neonati zonder bijnierschorsafwijkingen - TABLE VI-Newborn infants without adrenal disease

N ^o case	Naam Name	H ₄ F	H ₄ E	"allo- H ₄ F"	"U"	E	F	H ₄ S	S	H ₄ B	"allo- H ₄ B"	H ₄ A	A	B	Ald.	$\frac{H_4F}{H_4E}$	F/E	Totaal F	Totaal B	F/B	% gediff. S
15	Baby S.	5	32	-	2	6	12	1	-	3	5	6	3	7	-	0,15	2,0	57	24	2,3	1,8
16	Baby H.	2	160?	-	2	12	15	2	-	7	-	16	2	16	-	0,01?	1,3	191?	41	4,6?	1,0?
17	Baby N.	3	28	-	1,5	16	7	1,5	-	35	1	2,5	2	16	-	0,1	0,4	56	57	1,0	2,7

Het ligt voor de hand dit afwijkend excretie-patroon toe te schrijven aan een onvermogen van de beschadigde lever tot snelle metabolisering van de actieve steroïden.

De toename in de excretie van aldosteron is zeer opvallend en het is waarschijnlijk dat dit wordt veroorzaakt door twee factoren: vertraagde metabolisering en verhoogde productie. Een stimulans voor verhoogde aldosteronsecretie is duidelijk aanwezig in de vorm van een voortdurende verplaatsing van vocht uit de bloedbaan naar de extravasculaire ruimten (ascites- en oedeemvorming) en de hiermee samenhangende vermindering van het bloedvolume.

Verhoogde productie van F is onwaarschijnlijk: in het klinische beeld zijn hiervoor geen aanknopingspunten te vinden en uit het spectrum blijkt dat de excretie van de totale F-groep zeker niette hoog is en zelfs laag-normaal is te noemen.

Dat er bij levercirrhose toch een verhoogde excretie van F kan optreden, moet worden toegeschreven aan een toename van de hoeveelheid niet aan eiwit gebonden en dus filtreerbaar F in het plasma. De stijging van de filtreerbare fractie hangt waarschijnlijk samen met de vertraagde metabolisering waardoor zelfs bij normale dagproductie de bindingscapaciteit van het transport-eiwit (transcortine) kan worden overschreden; de bindingscapaciteit zelf kan bovendien zijn verlaagd doordat er tengevolge van een gestoorde eiwitsynthese minder transcortine beschikbaar is dan normaal. Zo is te verklaren dat een relatief groot percentage van de (normale) dagproductie de nier in filtreerbare vorm bereikt en dus wordt uitgescheiden. Dezelfde beschouwing is van toepassing op B; uit de hoge excretie-waarden van B en A (procentueel sterker gestegen dan F en E) mag dus ook niet zonder meer een toegenomen productie van B worden afgeleid. De excretie van de B-groep is echter hoog-normaal en in combinatie met de laag-normale excretie van de F-groep resulteert dit in een lage F/B-ratio. Er zijn dus aanwijzingen dat de secretie van B zo niet absoluut, dan toch relatief hoog is en dat de stelling van Peterson (1960) dat bij patienten met *matig* ernstige levercirrhose zowel de productie van F als van B is verminderd, bij onze patient met gedecompenseerde levercirrhose niet opgaat wat de B-productie betreft.

Wij vermoeden dat de B-secretie in de eindfase van de ziekte (weer) is gestegen en dat dit in verband gebracht kan worden met het secundair hyperaldosteronisme (par. J).

Dit geval illustreert het belang van een gecombineerde bepaling van hormonen en metaboliëten. Laat men uit het spectrum de hormonen resp. de metaboliëten weg, dan zou de onjuiste diagnose bij nierhypofunctie resp. bij nierhyperfunctie kunnen wor-

den gesteld (vgl. Cope, 1959). Het complete spectrum wijst echter duidelijk in de richting van een leverfunctiestoornis als voornaamste oorzaak van het abnormale patroon. De bepaling kan dus bij deze patient als een leverfunctieproef worden beschouwd.

Uit het feit dat E en A in dezelfde verhoogde mate worden uitgescheiden als F en B kan blijken dat vooral de omzetting in tetrahydro-verbindingen een functie van de lever is; de omzetting van de hormonen in hun 11-dehydro-metaboliëten E en A is blijkbaar niet gebonden aan een intacte leverfunctie.

14. Patiente W., 18 jaar; mobiel.

Diagnose: mannelijk pseudo-hermaphroditisme.

Symptomen: gespleten scrotum met gonaden in de "labia maiora", ontbrekende vagina; geen mamma-ontwikkeling; geen geslachtschromatine in de celkernen van het mondslijmvlies.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 20 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 37,3 mgr/24 uur; de uitscheiding van 17-oxo-steroiden steeg duidelijk na toediening van gonadotrophine na toediening van ACTH was de stijging veel geringer.

De urine werd ons voor onderzoek toegestuurd omdat werd getwijfeld aan de diagnose adrenogenitaal syndroom die elders op grond van steroidbepalingen in urine was gesteld. De excretie van de F-groep en de F/B-ratio is hoog maar, geziende leeftijd en de activiteit, waarschijnlijk nog wel binnen de normale variatiebreedte.

Van de totale hoeveelheid 17-hydroxy-steroiden, als groep bepaald (20 mgr), komt 29 % voor rekening van de som der individueel bepaalde 17-hydroxy-steroiden (F-groep + H_4S). Dit is normaal (par. C₃) en zou er op kunnen wijzen dat er niet abnormaal veel 21-desoxy-steroiden worden geproduceerd, zoals bij viriliserende hyperplasieën regel is. De twijfel t. a. v. de diagnose adrenogenitaal syndroom leek ons dan ook alleszins gerechtvaardigd.

Dat deze mening juist was, kan blijken uit de resultaten van een urine-onderzoek dat werd verricht na gonadectomie: de excretie van 17-oxo-steroiden was gedaald tot 12,2 mgr/etmaal, de excretie van 17-hydroxy-steroiden bedroeg nu 16,5 mgr/etmaal.

De spectrum-bepaling in deze post-operatieve urine leverde volkomen normale waarden op (spectrum 14^a).

F. Het spectrum van neonati zonder bijnierschorsafwijkingen.

Overzichtstabel; tabel VI.

15. Baby S., 3 maand oud; à term geboren; geboorte-gewicht 4500 g.
Observatie wegens braken e. c. i.
16. Baby H., 14 dagen oud; à term geboren; geboorte-gewicht 2500 g.
Observatie wegens voedingsmoeilijkheden.
17. Baby N., 14 dagen oud; 5 weken praematuur geboren; geboorte-gewicht 1650 g.

Uiteraard is bij deze pasgeborenen de excretie van alle corticosteroiden aanzienlijk geringer dan bij volwassenen. Opvallend zijn de volgende kwantitatieve verschillen:

1. het geringe percentage tetrahydro-metabolieten:
de ratio $H_4F + H_4E / F + E$ is bij de babies resp. 2; 6 ?; 1, 3; bij volwassenen ± 20 ;
de ratio $H_4B + \text{allo-}H_4B + H_4A / B + A$ is bij de babies resp. 1, 4; 1, 3; 2, 1; bij volwassenen ± 18 .
In dit opzicht tonen de spectra veel overeenkomst met het excretie-patroon van volwassenen met ernstige, diffuse leverbeschadiging: bij patient D. met ernstige levercirrhose bijv. was de verhouding in de F-groep 1, 5 en in de B-groep 0, 7. Het is dan ook waarschijnlijk dat de gebrekkige metabolisering van de hormonen door de nog onvolwaardige neonatus-lever de oorzaak is van de relatief lage excretie van de tetrahydro-metabolieten. Ook in deze gevallen blijkt weer dat omzetting in de 11-dehydro-metabolieten blijkbaar onafhankelijk van de lever kan plaatsvinden.
2. een relatief hoge excretie van H_4E ten opzichte van H_4F . De H_4E -waarde in het spectrum van baby H. is zo extreem hoog en de H_4F/H_4E ratio dientengevolge zo extreem laag, dat wij betwijfelen of hier wel H_4E is bepaald. Achteraf blijkt ook, dat op de UV -fotocopie van stadium I wel een zeer intensieve BT-positieve vlek staat afgetekend, maar deze ligt vlak bij de startlijn en niet op de H_4E plaats.
Deze substantie, waarvan de aard volkomen onbekend is, heeft blijkbaar in het systeem Bush C toevallig dezelfde R_f -waarde gehad als het referentie-steroid H_4E en is zo oorzaak geworden van een foutieve conclusie. In de tabel zijn dan ook vraagtekens geplaatst achter H_4E en alle parameters die door dit steroid worden beïnvloed.
3. een relatief hoge excretie van B en zijn metabolieten, met als gevolg een lage F/B-ratio, speciaal bij het praematuur geboren kind.

Migeon (1959) heeft onlangs in een samenvattend artikel op enkele bijzonderheden van het F-metabolisme bij pasgeborenen gewezen:

1. de biologische halfwaarde-tijd van F is 2 à 4 x zo lang als

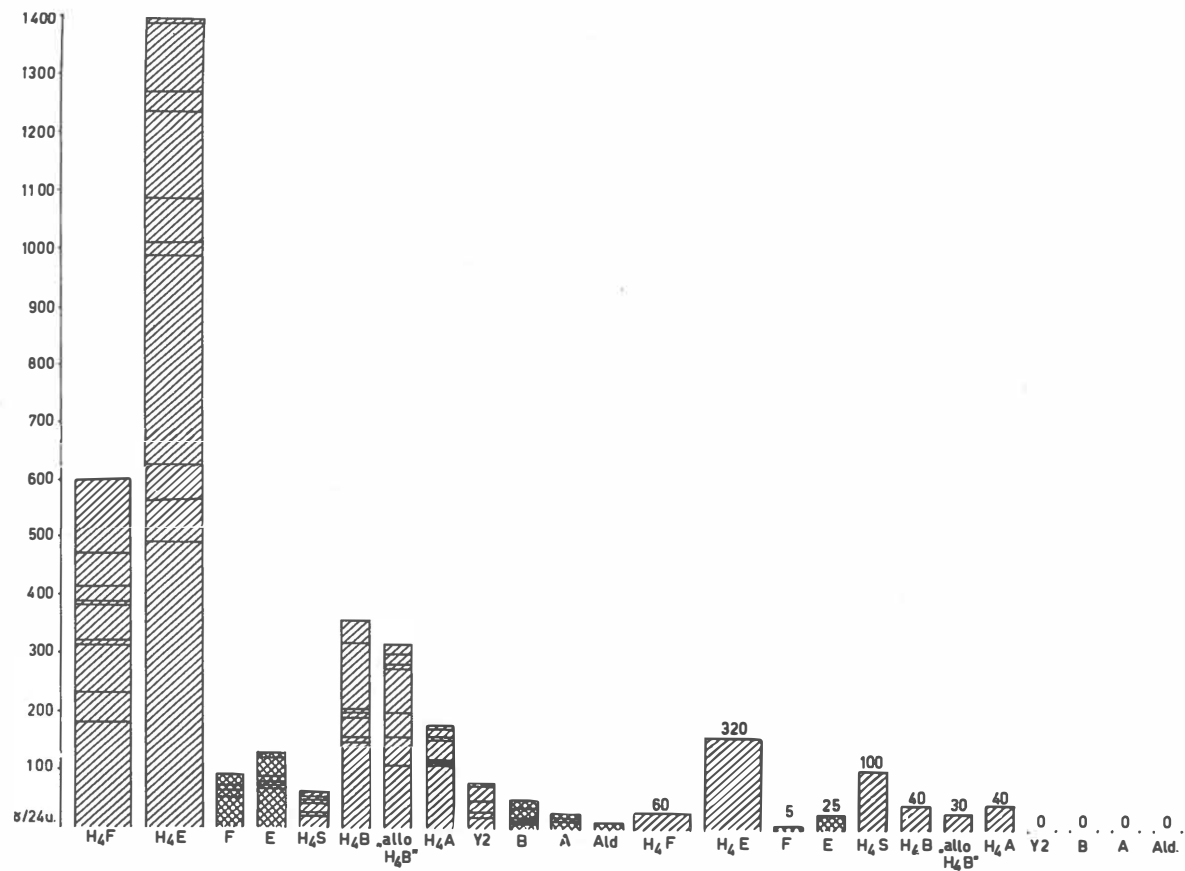


Diagram 4. M. Addison. (spectrum 19)

Addison's disease. (case 19)

2. zowel de omzetting in tetrahydro-metabolieten als de conjugering van deze verbindingen met glucuronzuur zijn kwantitatief veel minder belangrijk dan bij volwassenen. Een dergelijke conclusie kan ook uit ons oriënterend onderzoek worden getrokken.
3. na toediening van radioactief F aan babies is slechts + 30% van de uitgescheiden radioactiviteit uit de urine extraheerbaar te maken door een combinatie van de gebruikelijke zuur- en enzymhydrolyse; bij volwassenen is dit percentage + 70. Dit kan erop wijzen dat de F-metabolieten bij pasgeborenen voor een groot deel op andere wijze worden geconjugeerd dan bij volwassenen.
4. uit urines van babies is 6β -hydroxy-F in relatief grote hoeveelheden geëxtraheerd, terwijl dit metaboliet bij volwassenen waarschijnlijk van zeer ondergeschikt belang is. Hoewel onze methodiek eigenlijk niet geschikt is voor kwantitatieve bepaling van dergelijke hoogpolaire steroïden, hebben wij bij rechromatografie van fractie I/I in het systeem Bush C een belangrijke hoeveelheid van een BT-positieve, F1-positieve substantie waargenomen, polair van H_4F . Het is zeer wel mogelijk dat dit 6β -hydroxy-F is geweest. Uit bovenstaande blijkt duidelijk met hoeveel reserve de spectra van pasgeborenen geïnterpreteerd dienen te worden. De beschouwing die wij in paragraaf J aan de mogelijke betekenis van de lage F/B-ratio bij pasgeborenen hebben gewijd, heeft dan ook min of meer het karakter van een speculatie.

G. Het spectrum van patienten met een hypofunctie van de bijnierschors.

Overzichtstabel; tabel VII.

1. Primaire bijnierinsufficiëntie-M. Addison.

18. Patiente v.d. L., 65 jaar.

Diagnose: M. Addison met ernstige stoornissen in de water-en zouthuishouding.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 1,7 mgr/24 uur; na 25 mgr ACTH i. v. 5,9 mgr/24 uur. Excretie van 17-oxo-steroiden 4,0 mgr/24 uur; na ACTH 6,8 mgr/24 uur.

Aetiologie niet bekend.

19. Patient Ba., 33 jaar. Diagram 4.

Diagnose: M. Addison, met ernstige stoornissen in de water-en zouthuishouding. Longtuberculose.

In beide gevallen was het nog mogelijk met de instelling van de substitutie-therapie te wachten totdat een 24 uren urine was verzameld. In overeenstemming met het klinische beeld van een gedecompenseerde M. Addison, blijkt uit de twee vrijwel identieke spectra een zeer geringe excretie van alle hormonen en metabolieten. Het is opvallend dat in beide gevallen de excretie van H_4S volkomen normaal is.

TABEL VII-Patienten met hypofunctie van de bijnierschors - TABLE VII-Patients with adrenal cortical insufficiency

N ^o case	Naam Name	Diagnose Diagnosis	H ₄ F	H ₄ E	"allo- H ₄ F"	"U"	E	F	H ₄ S	S	H ₄ B	"allo- H ₄ B"	H ₄ A	A	B	Ald.	H ₄ F H ₄ E	F/E	Totaal F	Totaal B	F/B	% gediff. S
18	v. d. L.	M. Addison	100	375	-	5	15	25	130	-	50	25	30	sp	10	0	0,3	1,7	520	115	4,5	20
19	Ba.	"	60	320	-	0	25	5	105	-	40	30	40	0	0	0	0,2	0,2	410	110	3,7	21
20	L.	"	560	1280	100	10	30	30	200	-	50	20	30	0	15	0	0,4	1,0	2010	115	17,4	9
20 ^a	"	"	720	1280	200	10	60	30	400	-	50	50	60	0	10	144	0,6	0,5	2300	170	13,5	15
21	Z. -U.	Panhypopit.	120	50	-	0	10	5	10	-	30	25	10	0	0	25 (6)	2,4	0,5	185	65	2,8	5,1
22	Fo.	"	90	225	-	2	8	4	26	-	24	28	24	0	sp	sp	0,4	0,5	329	76	4,3	7,4
23	R.	"	320	280	-	5	25	30	100	-	20	5	10	0	sp	3	1,1	1,2	660	35	18,7	13,2
24	W. -B.	"	240	640	-	10	40	35	30	-	70	40	20	sp	10	0,5	0,4	0,9	965	140	6,8	3

20. Patient L., 32 jaar.

Diagnose: M. Addison. Longtuberculose; op 17-jarige leeftijd gonitis tuberculosa.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 6,9 resp. 8 mgr/24 uur; na 25 mgr ACTH i.v. 7,3 mgr/24 uur.

Excretie van 17-oxo-steroiden 9,7 resp. 15,2 mgr/24 uur; na ACTH 14,8 mgr/24 uur.

Van deze patient werden twee spectra bepaald op verschillende dagen; de tweede bepaling (spectrum 20^a) werd uitgevoerd nadat op de verzamel dag 4 mgr aldosteron per 8 uren infuus was toegediend met de bedoeling om de excretie hiervan na te gaan. Daarna werd met de substitutie-therapie begonnen.

Patient verkeerde niet in een toestand van dreigende shock en in overeenstemming met het betrekkelijk lichte ziektebeeld is de steroid-excretie wel onmiskenbaar pathologisch, vooral wat de B-groep betreft, maar niet zo laag als bij de andere patienten met M. Addison.

De excretie van H₄S is zelfs aanzienlijk hoger dan normaal; deze waarneming bevestigt de indruk dat H₄S een bijzondere plaats inneemt in het spectrum van Addison-patienten. In paragraaf K wordt hierop nader ingegaan.

Spectrum 20^a geeft in grote lijnen hetzelfde beeld; de verschillen zijn te verklaren door kleine dagelijkse variaties in de hormoonsecretie die ook tot uiting komen in de groepsbepalingen. Van het toegediende aldosteron werd volgens de spectrumbepaling $\pm 200 \mu\text{g}$ en volgens de Neher-Wettstein-methode $144 \mu\text{g}$ met de urine van dezelfde dag uitgescheiden; van de 4 mgr aldosteron werd dus 3,5 à 5% in de urine teruggevonden.

2. Secundaire bijnierinsufficiëntie-Panhypopituitarisme.

21. Patiente Z.-U., 39 jaar.

Diagnose: panhypopituitarisme na operatieve verwijdering van een groot chromophoob adenoom.

Prae-operatieve symptomen: amenorrhoe; ernstige gezichtsveldbeperking.

Post-operatieve symptomen: passagere diabetes insipidus; basaal metabolisme -31%, eiwit-gebonden jodium 1,9 $\mu\text{g}\%$; bloeddruk 105/80 - 90/70, electrolyten normaal.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 3,2-2,5-2,6 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 5,6 - 2,0 - 4,1 mgr/24 uur.

De urine werd verzameld drie weken na de operatie, voor de instelling van de substitutie-therapie met hydrocortison en schildklierpoeder.

Uit het spectrum blijkt dat de excretie van de F-en B-groep bij deze patiente nog lager ligt dan bij de twee patienten met een gedecompenseerde M. Addison.

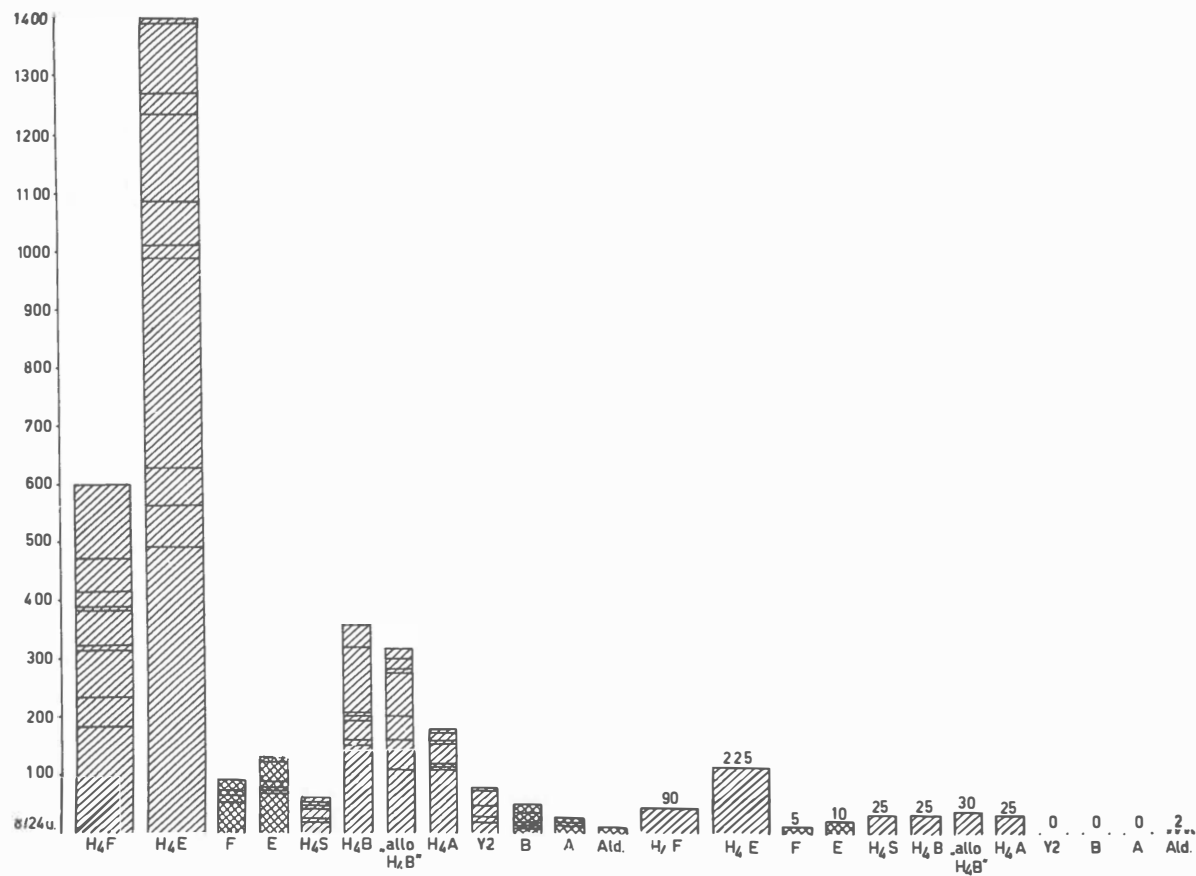


Diagram 5. Panhypopituitarisme. (spectrum 22)

Panhypopituitarism. (case 22)

Dit is, wat H_4E betreft, ook waargenomen door Cope en Black (1959). Deze onderzoekers vonden bij zes Addison-patienten een gemiddelde H_4E -excretie van $390 \mu g/24$ uur en bij zes patienten met panhypopituitarisme een gemiddelde H_4E -excretie van $200 \mu g/24$ uur (spreiding $48-360 \mu g/24$ uur).

Dat de klinische toestand van patiente desondanks veel minder ernstig was, kan worden toegeschreven aan het behoud van de aldosteronproductie die, blijkens de verhoogde excretie van aldosteron, zelfs is toegenomen.

Deze bevinding is in overeenstemming met de waarnemingen bij proefdieren dat aldosteron kan worden geproduceerd zonder tussenkomst van de hypofyse (vgl. Gross, 1959) en met de opvatting van Farell (1960) dat de aldosteronsecretie wordt gereguleerd door een "glomerulotrophine" dat in een mesencephaal centrum, mogelijk de epiphyse, zou worden geproduceerd.

Bij de mens is door Hökfelt c.s. (1959a) vastgesteld dat hypophysectomie wordt gevolgd door een abrupte daling in de excretie van de F-groep maar een duidelijke stijging in de excretie van aldosteron.

Op den duur schijnt toch ook de aldosteronproductie zich zonder ACTH niet te kunnen handhaven. Vier maanden na de operatie was nl. heropname noodzakelijk wegens verschijnselen van dreigende circulatie-insufficiëntie. De aldosteron-excretie bleek toen gedaald tot $6 \mu g/24$ uur; de therapie moest worden aangevuld met DOCA-injecties.

22. Patient Fo., 75 jaar. Diagram 5.

Diagnose: panhypopituitarisme; chromophoob adenoom.

De therapie bestond sinds een jaar uit substitutie met cortison en schildklierpoeder.

Het spectrum werd bepaald nadat de cortison-therapie drie weken tevoren was gestaakt.

De zeer lage excretie van alle hormonen en alle metabolieten is in overeenstemming met de klinische diagnose en de lange duur van de hypofyse-insufficiëntie.

23. Patient R., 60 jaar.

Diagnose: panhypopituitarisme.

In 1950 werd de diagnose gesteld op passagère postencephalitis Parkinsonisme met myxoedeem.

Symptomen in 1959: typisch myxoedeem; zeer schaarse secundaire beharing, vitiligo; atrofische testes; bloeddruk $120/95$, electrolyten normaal; sella turcica normaal.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden $2,6 - 2,7 \text{ mgr}/24$ uur, van 17-oxo-steroiden $4,1 - 5,7 \text{ mgr}/24$ uur.

De excretie van de F-groep is duidelijk verlaagd, hoewel niet zo sterk als bij de patienten Fo. en Z.-U., die beide substitutie-therapie behoeften. De excretie van aldosteron is normaal. Het behoud van de aldosteronsecretie is een verklaring

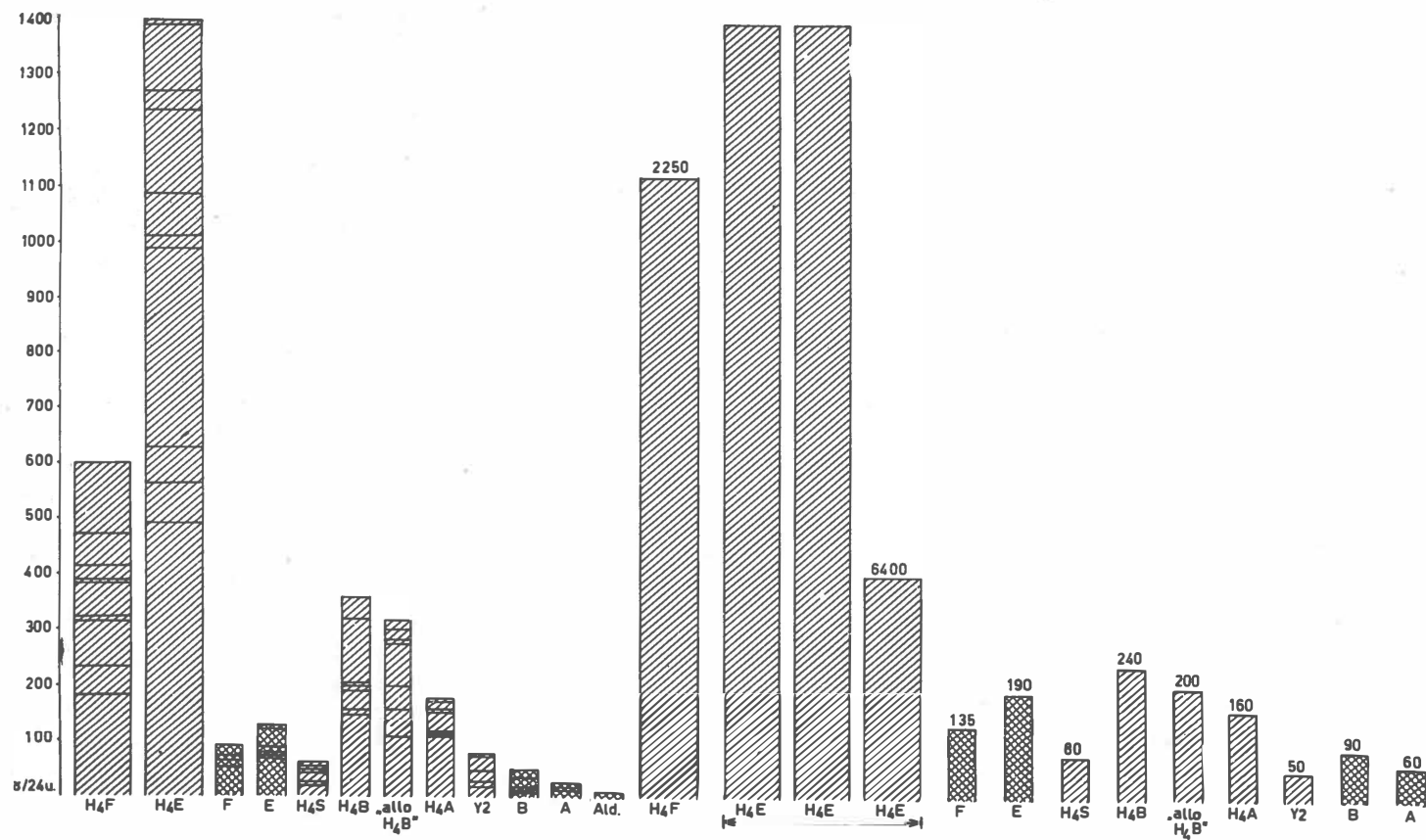


Diagram 6. Syndroom van Cushing-hyperplasie.
(spectrum 25)

Cushing's syndrome-hyperplasia.
(case 25)

voor de betrekkelijk goede toestand waarin patient verkeerde. Een vertraagde metabolisering van de biologisch actieve steroïden, samenhangend met de ernstige hypothyreoidie, zal hiertoe eveneens hebben bijgedragen.

De hoge F/B-ratio en H₄S-excretie zullen nader worden besproken in de paragrafen J resp. K.

Beide bijzonderheden zijn moeilijk te duiden. Het enige aangrijpingspunt voor een verklaring biedt de bijzondere genese van de hypophyse-insufficiëntie, waarvoor bij deze patient anamnestiche aanwijzingen bestaan (encephalitis).

24. Patiente W. -B., 75 jaar.

Diagnose: panhypopituitarisme? Osteoporose.

Symptomen: hypothyreoidie; zeer schaarse secundaire beharing; labiele bloeddruk; normochrome anaemie; vlakke glucose-belastingscurve; sella turcia normaal.

De excretie van alle hormonen en alle metabolieten is laag en zelfs wanneer de hoge leeftijd en de bedrust in aanmerking worden genomen, waarschijnlijk wel te laag.

H. Het spectrum van patienten met een pathologische hyperfunctie van de bijnierschors.

1. Syndroom van Cushing.

Overzichtstabel; tabel VIII.

25. Patiente O., 40 jaar. Diagram 6.

Diagnose: syndroom van Cushing sinds 1951.

Symptomen: typische adipositas; rond, plethorisch gelaat; striae; hirsutisme; huid- en spieratrofie; diabetes mellitus; bloeddruk 155/90 - 200/120, electrolyten normaal. Excretie van 17-hydroxy-steroiden 6,1 - 13,1 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 17,7 - 24,2 mgr/24 uur.

Anatomische diagnose: dubbelzijdige bijnierschorshyperplasie, vooral van de zona reticularis.

De excretie van de F-groep is, in overeenstemming met het klinische beeld, duidelijk verhoogd; de excretie van de B-groep ligt binnen normale grenzen; de F/B-ratio is hoog.

Aldosteron werd niet bepaald.

De excretie van F en E ligt slechts weinig boven normaal; blijkbaar is de lever door intensivering van de metabolische omzettingen in staat de plasma-concentraties van de actieve steroïden nog binnen enigszins redelijke grenzen te houden.

26. Patiente J. -A., 57 jaar. Diagram 7.

Diagnose: Syndroom van Cushing (carcinoom).

Symptomen: typische adipositas; rond, plethorisch gelaat; huidatrofie; capillair-fragiliteit; diabetes mellitus sinds 2 jaar; osteoporose; bloeddruk 160/90 - 185/105, normale electrolyten.

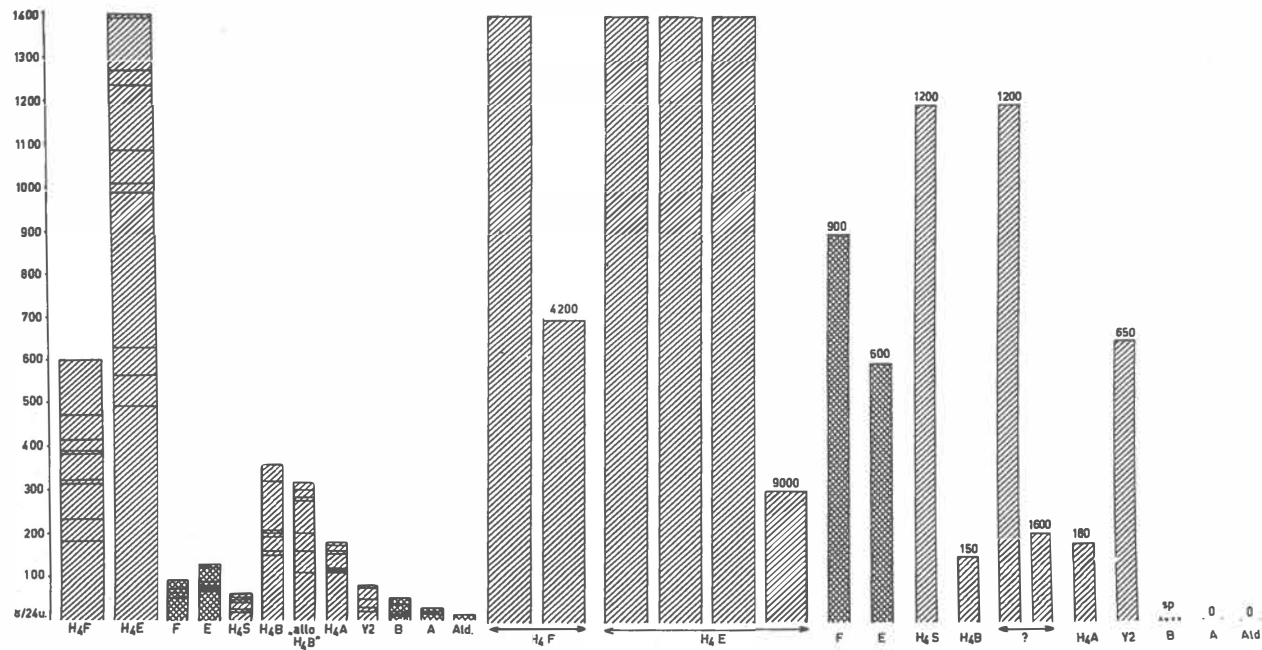


Diagram 7. Syndroom van Cushing-carcinoom.
(spectrum 26)

Cushing's syndrome-carcinoma.
(case 26)

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 6,6 - 9,5 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 67,2-128,9 mgr/24 uur.

Anatomische diagnose: carcinoom van 600 g, uitgaande van de rechter bijnier; linker bijnier atrofisch.

Het eerste spectrum (26) werd bepaald in urine die voor de operatie (maart 1959) werd verzameld; het tweede spectrum (26^a) werd bepaald in urine die vlak voor de dood (dec. 1959) werd verzameld. De excretie van 17-hydroxy-steroiden en 17-oxo-steroiden was toen gestegen tot resp. 77,5 en 183,7 mgr/24 uur; plasma-F 68 μ g % (normaal < 25), plasma-B 0,4 μ g % (normaal).

Bij obductie bleek dat zich in de tussenliggende periode een mانشoofd-grote metastase in de rechter leverkwab had ontwikkeld.

In overeenstemming met het klinische beeld van een ernstig, snel progressief syndroom van Cushing blijkt de excretie van de F-groep nog aanzienlijk hoger te liggen dan bij patiënte O. In dit geval werden ook de biologisch actieve steroiden uit deze groep in sterk verhoogde mate uitgescheiden; blijkbaar heeft de lever nunit meer de enorme productie van F kunnen compenseren.

Bij de bepaling van de B-groep werden moeilijkheden onder-vonden. Terwijl uit de lage excretie van H₄B, H₄A, B en A kon worden afgeleid dat B niet in het pathologisch proces was betrokken, werd toch voor allo-H₄B een zeer hoge waarde gevonden.

Uit deze discrepantie werd de conclusie getrokken dat de ge-isoleerde substantie geen metaboliet van B kon zijn en met name geen allo-H₄B. Bij rechromatografie in het systeem propyleenglycol/tolueen werd dit vermoeden bevestigd. Het grootste deel van de onbekende substantie bleek een R_f te hebben van 0,37 en slechts een klein gedeelte had een R_f van 0,45. Aangezien de R_f van H₄B in dit systeem 0,32 bedraagt en de R_f van allo-H₄B 0,45, kan alleen dit kleine gedeelte identiek zijn met allo-H₄B. Pogingen tot nadere identificatie van het andere deel van de onbekende zijn nog niet gedaan; de substantie is niet identiek met H₂E maar mogelijk wel met Y_a.

Substantie Y₂, ook gelegen temidden van de B-metabolieten, blijkt hier eveneens in onverwacht grote hoeveelheid aanwezig. De identiteit is ons niet bekend; het is opvallend dat noch Y₂, noch de andere onbekende substantie ("Y_a") in duidelijke verhoogde mate worden uitgescheiden na stimulatie van normale bijnieren met ACTH.

Door de "besmetting" van de allo-H₄B-plaats op het 2e chromatogram met de grote hoeveelheid gelijk reagerend "Y_a" zijn wij niet in staat geweest de allo-H₄B kwantitatief uit deze urine te isoleren. Het totaal van de B-groep werd arbitrair op \pm 500

TABEL VIII-Patienten met een syndroom van Cushing - TABLE VIII-Patients with Cushing's syndrome

Nº case	Naam Name	Diagnose Diagnosis	H ₄ F	H ₄ E	"allo-H ₄ F"	"U"	E	F	H ₄ S	S	H ₄ B	"allo-H ₄ B"	H ₄ A	A	B	Ald.	$\frac{H_4F}{H_4E}$	F/E	Totaal F	Totaal B	F/B	% gediff.S
25	O.	Hyperpl.	2250	6400	-	40	190	135	80	-	240	200	160	60	90	-	0,4	0,7	9015	750	12,0	0,9
26	J. -A.	Carcinoma	4200	9000	-	100	600	900	1200	-	150	(1200)	180	-	sp	0	0,5	1,5	14800	±500	±30	7,5
26 ^a		Carc.+Metast.	8800	9000	-	-	960	3800	1600	100	(1600)	(1280)	160	-	sp	0	0,4	4,0	17600	±500	±35	8,8
27	M.	Carcinoma	6400	5120	200	160	480	1600	2560	80	320	(640)	80	-	40	0	1,3	3,3	13960	±500	±28	16
28	v. d. H.	Hyperpl. ?	900	3840	-	25	165	140	35	-	155	200	110	30	50	8	0,2	0,9	5070	545	9,3	0,7
29	R. -R.	Pit. aden. (post op.)	960	2560	-	20	140	80	50	-	360	280	220	5	20	12	0,4	0,6	3760	885	4,2	1,3

Nº case	Naam Name	Diagnose Diagnosis	H ₄ F	H ₄ E	"allo-H ₄ F"	"U"	E	F	H ₄ S	S	H ₄ B	"allo-H ₄ B"	H ₄ A	A	B	Ald.	$\frac{H_4F}{H_4E}$	F/E	Totaal F	Totaal B	F/B	% gediff.S
30	M. -F.	Hyperpl.	400	1400	-	25	100	40	70	-	60	40	50	sp	15	-	0,3	0,4	1965	165	11,8	3,5
31	Sche.	Hyperpl.	480	1800	-	30	70	55	60	-	60	(400)	40	sp	10	8	0,3	0,8	2435	±175	±14,0	2,4
32	v. T.	Carcinoma	1280	2560	<160	-	440	320	1280	20	±40	(560)	20	0	0	12	0,5	0,7	4600	±100	±46	22

TABEL IX-Patienten met een adrenogenitaal syndroom - TABLE IX-Patients with adrenogenital syndrome

μg gesteld; op deze wijze werd een F/B-ratio van ± 30 verkregen.

Aangezien ook geen aldosteron kon worden aangetoond, kan uit deze gegevens worden afgeleid dat de carcinoomcellen vrijwel uitsluitend F hebben geproduceerd.

Een interessante bijzonderheid is de aanwezigheid van een grote hoeveelheid H_4S , waarop nog nader wordt ingegaan. S zelf hebben wij in de prae-operatieve urine niet kunnen aantonen. Uit de urine, die enkele dagen voor de dood werd verzameld, werden zoveel steroiden in zo grote hoeveelheden geïsoleerd (spectrum 26^a) dat het ondoenlijk is om hiervan in kort bestek een geordend overzicht te geven.

In de kolom "opmerkingen" van de overzichtstabel zijn de belangrijkste niet-geïdentificeerde substanties uit stadium III genoemd. Andere onbekende substanties zijn in de kolommen H_4B en "allo- H_4B " aangegeven; de excretie-waarden zijn tussen parenthesen geplaatst om aan te duiden dat de substanties vrijwel zeker niet identiek zijn met de steroiden die in deze kolommen thuishoren.

Het abnormale excretie-patroon berust op de combinatie van een chaotische synthese van steroiden door een grote massa pathologische functionerend bijnierschorsweefsel en een verminderde metabolisering van deze steroiden door een zwaar beschadigde lever.

De excretie van F is nu ongeveer 40 x zo hoog als normaal, terwijl de concentratie van F in het plasma slechts 6-voudig is gestegen. Opblz. is reeds vermeld dat dit verschil zeer waarschijnlijk samenhangt met een sterke stijging van het percentage filtreerbaar F in het plasma. In overeenstemming met de normale excretie van de B-groep werd door Arzt een normale hoeveelheid B in het plasma aangetoond.

In fractie II/III werd een BT-positieve, F1-positieve substantie aangetoond die ook in het systeem formamide/benzeen dezelfde Rf-waarde bleek te hebben als authentiek S. Op grond van de chemische eigenschappen en het chromatografisch gedrag in de drie systemen werd de substantie geïdentificeerd als S. Gezien de vernietiging van een groot deel van de lever kon worden verwacht dat het actieve steroid nu naast zijn tetrahydro-metaboliet in de urine zou verschijnen. De hoeveelheid in de 24 uren urine bedroeg $\pm 100 \mu\text{g}$.

27. Patiente M., 18 jaar.

Diagnose: syndroom van Cushing (carcinoom).

Symptomen: typische adipositas; rond, plethorisch gelaat; striae; oligomenorrhoe; pathologische glucose-belastingscurve; bloeddruk 150/100; serum Na 156 maeq/l, serum K 4,5 maeq/l.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 49,3 mgr/24 uur, van

TABEL VIII^a

Excretie van corticosteroiden ($\mu\text{g}/24$ uur) bij patienten met het syndroom v. Cushing
Literatuur-overzicht

	H ₄ F	H ₄ E	F	E	H ₄ S	H ₄ B	allo- H ₄ B	H ₄ A	B	A	Ald.
Kinsella en Glick	-	12100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Richardson c. s.	2500-9100 (H ₄ F + H ₄ E)		170-1100	190-1200	250-15000	-	-	-	-	-	-
Romani	3700-8900	3740-11000	451-1368	369-396	0-96	84-1080	84-384	95-336	sp-276	0-60	1-16
Johnson c. s.	-	-	234-1100	234-1700	-	-	-	-	-	-	-
Bush en Willoughby	3500-5300	3900-5700	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baulieu en Jayle	1100-1500	3300-4500	300-700	20-350	-	-	-	-	-	-	-
Höckfelt c. s. (1959) (methode Romanoff)	14200	15000	1000	1100	2500	-	-	-	-	-	0,6

17-oxo-steroiden 28,8 mgr/24 uur.

Anatomische diagnose: carcinoom, uitgaande van de linker
bijnier.

Het spectrum toont grote overeenkomst met dat van patiënte J.
-A.

- a. een zeer hoge excretie van de totale F-groep, waarin ook de actieve steroiden sterk zijn vertegenwoordigd; binnen de groep der tetrahydro-metaboliëten is de procentuele toename van H_4F het grootst; de F/E-ratio is aanzienlijk verhoogd.
- b. er is geen verhoogde excretie van de B-groep; de F/B-ratio is dientengevolge zeer hoog.
- c. de aldosteron-excretie is nihil, zodat ook dit hormoon blijkbaar niet bij het pathologisch gebeuren is betrokken.
- d. de excretie van H_4S is weer extreem hoog; de isolering van 80 μg S is hiermee in overeenstemming.
- e. in fractie II/I is weer een onbekende substantie aanwezig (640 μg) met dezelfde eigenschappen als Y_a .
- f. in fractie II/III is behalve S een grote hoeveelheid Y_2 (1280 μg) aanwezig.
- g. in stadium III werden drie fracties zichtbaar; hieruit werden enkele onbekende substanties geïsoleerd, die mogelijk identiek zijn met de substanties die werden aangetroffen in stadium III van patiënte J. -A.

De betekenis van de zeer hoge excretie van H_4S , bij twee patiënten met bijniercarcinoom aangetoond, zal in paragraaf K uitvoerig worden besproken in samenhang met gegevens uit de literatuur.

28. Patient van der H., 29 jaar.

Observatie syndroom van Cushing in verband met adipositas; rond, plethorisch gelaat; striae, huidatrofie; passagere glucosurie; bloeddruk 155/95.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 16,6 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 33 mgr/24 uur.

De opname geschiedde in eerste instantie in de Psychiatrische kliniek wegens chronisch alcoholisme.

De excretie van de F-groep ligt ondanks de bedrust duidelijk hoger dan bij de controle-groep van actieve mannen van vrijwel dezelfde leeftijd. Ook de F/B-ratio is hoog.

De beoordeling van deze gegevens zal worden uitgesteld tot paragraaf I, waar de spectra van deze patient na ACTH-stimulatie worden besproken.

29. Patiënte R. -R., 51 jaar.

Diagnose: status na verwijdering van een functionerend chromophoob adenoom.

In 1957 werd elders de diagnose syndroom van Cushing gesteld.

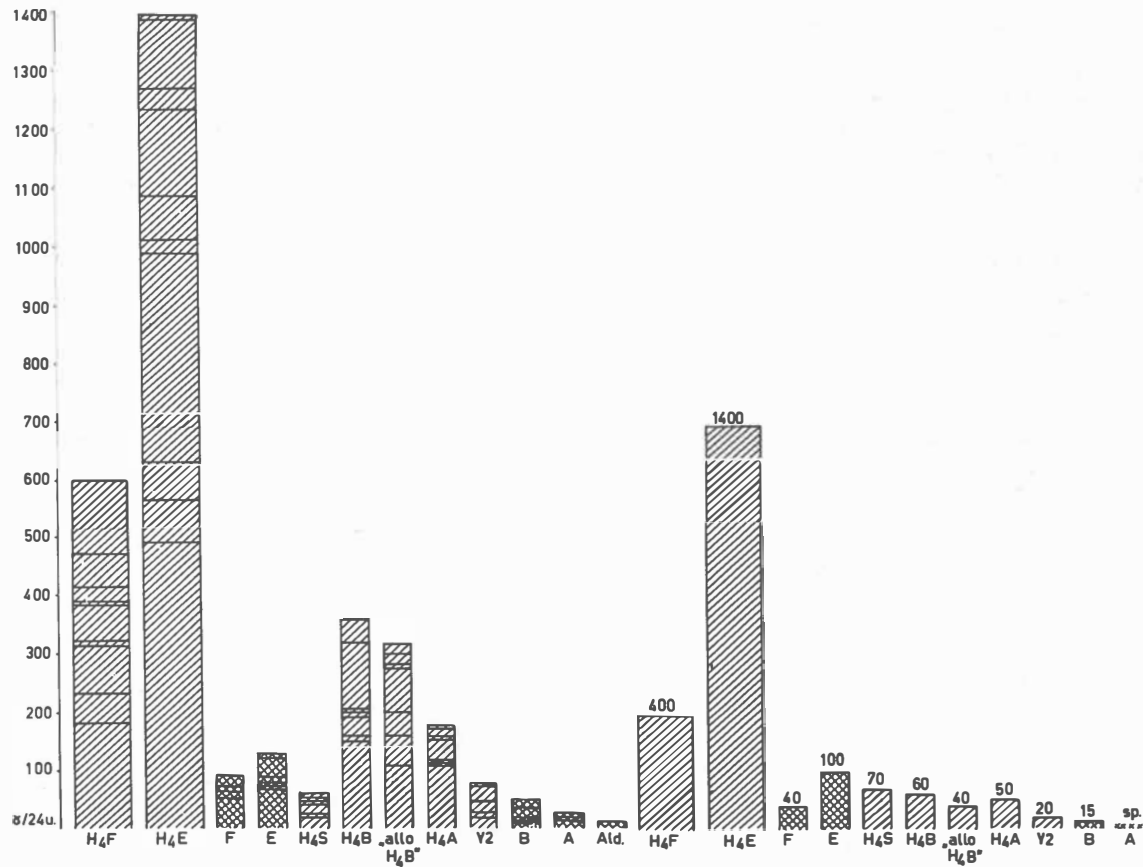


Diagram 8. Adrenogenitaal syndroom-hyperplasie.
(spectrum 30)

Adrenogenital syndrome-hyperplasia.
(case 30)

In 1958 werd een chromophoob adenoom van de hypofyse verwijderd, waarna een geleidelijke teruggang van de Cushing-symptomen werd waargenomen. Bij een observatie in 1959 werden klinisch geen aanwijzingen gevonden voor een recidief.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 12,8 mgr/24 uur (gemiddelde van negen bepalingen), excretie van 17-oxo-steroiden 16 mgr/24 uur (gemiddelde van negen bepalingen).

Het spectrum is volkomen normaal en in overeenstemming met de klinische indruk.

De excretie van corticosteroiden bij patiënten met het syndroom van Cushing, zoals bepaald door verschillende onderzoekers, is weergegeven in tabel VIII^a. Overeenkomstig de grote verschillen in pathogenese en symptomatologie van het syndroom, lopen de opgegeven waarden sterk uiteen.

De betekenis van de excretie-bepaling van F en zijn metabolieten voor de diagnose van het syndroom van Cushing is door Cope (1959) nagegaan bij 12 patiënten (niet vermeld in de tabel). Hij vond gemiddeld een 8-voudige stijging van F, een 3-voudige stijging van H₄F en een 2-voudige stijging van H₄E.

Hoewel de excretie van F in drie van zijn gevallen nauwelijks verhoogd was, komt de *hyper*functie van de bijnier dus over het algemeen het best tot uiting in de excretie van dit steroid. Voor de diagnose van een *hypo*functie beschouwt Cope de excretie van H₄F en H₄E als het gevoeligste criterium.

2. Adrenogenitaal syndroom.

Overzichtstabel; tabel IX.

30. Patiente M. -F., 33 jaar. Diagram 8.

Klinisch beeld: ernstige adipositas en ernstig hirsutisme sinds het 17e jaar; oligomenorrhoe, steriliteit; geen tekenen van versterkt eiwit-katabolisme; geen hypertensie; normale glucose-belastingscurve.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 28,2 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 35,2 mgr/24 uur.

Anatomische diagnose (operatie-praeparaat): weinig uitgesproken hyperplasie van de zona reticularis (totaal bijniergewicht 18 g).

Het spectrum toont een geringe excretie van alle corticosteroiden en biedt geen enkel aanknopingspunt voor de diagnose syndroom van Cushing. Het klinische beeld en het 17-oxo-steroiden-getal wijzen op overproductie van steroiden met androgene werking.

Waarschijnlijk is hier dus sprake van een vorm van adrenogenitaal syndroom, waarvan men zich de pathogenese als volgt

kan voorstellen (Eberlein en Bongiovanni, 1960): tengevolge van een relatieve deficiëntie van het 21-hydroxylase is de hormoon-synthese in de bijnierschors gedeeltelijk geblokkeerd. Het dreigend tekort aan F leidt tot krachtige stimulering van de bijnierschors door ACTH met als gevolg toenemende productie van de androgene C_{19} -steroiden en de precursors van de C_{21} -reeks, o.a. progesteron en 17-hydroxy-progesteron. Aangezien dit laatste steroid en zijn derivaten (pregnaantriol, pregnaantriolon etc.) worden meebepaald met de methode van Norymberski kan overmatige productie en secretie van deze C_{21} -desoxy-steroiden leiden tot een hoog 17-hydroxy-steroiden-getal.

In deze gevallen kan de bepaling van het spectrum voorkomen dat men op grond van de groepsbepalingen ten onrechte de diagnose syndroom van Cushing stelt.

De geringe excretie van de B-groep en de hoge F/B-ratio is waarschijnlijk ook een gevolg van de langdurige stimulatie door ACTH; de argumenten voor deze opvatting worden genoemd in par. J.

31. Patiente Sche., 31 jaar.

Klinisch beeld: virile lichaamsbouw met hypertrofie van de clitoris; lage stem; ernstig hirsutisme; matige adipositas; geen kinderen, 1 x abortus. Geentekenen van versterkt eiwit-katabolisme; geen hypertensie; normale glucose-belastingscurve.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 28,2 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 47,7 mgr/24 uur.

Wat de F-groep en de diverse ratio's betreft, toont het spectrum grote overeenkomst met dat van patiente M.-F. Bij de bepaling van de B-groep werden dezelfde bijzonderheden opgemerkt als bij de patienten J.-A. en M., nl. een onevenredig hoge excretie van Y_a en Y_2 .

Wij zijn nog niet in de gelegenheid geweest om na te gaan of de overeenkomstige onbekenden uit de drie spectra identiek zijn.

De betekenis van deze bevindingen is onduidelijk.

32. Patiente v. T., 8 jaar.

Diagnose: metastaserend bijniercarcinoom.

Klinisch beeld: in 1957 werd een hypertrofie van de clitoris opgemerkt; in 1959 werd een necrotische en verkalkte bijniertumor verwijderd; begin 1960 progressieve virilisatie-verschijnselen en een zeer hoge excretie van 17-oxo-steroiden (182 mgr/24 uur); op de thorax-foto longmetastasen.

Bij onderzoek in de Kliniek van prof. Querido werden slechts zeer geringe aanwijzingen voor een syndroom van Cushing gevonden (aanduiding van moon-face); er was geen mammagroei; wel hypertrofie van de genitalia externa, forse pubisbeharings in vrouwelijke zin en beginnende haar-

groei in de oksels en op de bovenlip; acne vulgaris; bloeddruk 135/85, electrolyten normaal; uitscheiding van 17-ketogene steroiden ± 60 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden ± 200 mgr/24 uur.

Op 19 mei werd hypophysectomie verricht; de urine voor de spectrumbepaling werd op 29 juni verzameld na beëindiging van de cortison-therapie.

In het spectrum vallen de volgende bijzonderheden op:

- a. wanneer de leeftijd in aanmerking wordt genomen, is de excretie van de F-groep hoog; de verhoging is echter niet zo excessief als bij de andere patienten met bijniercarcinoom (J. -A. en M.) Het duidelijke verschil in symptomatologie is hiermee in overeenstemming.
- b. de excretie van F en E is wel zeer hoog; in combinatie met de relatief lage excretie van de tetrahydro-metabolieten wijst dit op een vertraagde metabolisering in de lever, hetzij door overbelasting, hetzij door beschadiging van de leverfunctie (metastasen?).
- c. evenals bij de andere carcinoompatienten is de excretie van H_4S zeer hoog. In overeenstemming hiermee werd $20 \mu g S$ geïsoleerd.
- d. een andere overeenkomst met deze patienten is de zeer hoge F/B-ratio, wat samenhangt met de geringe excretie van de B-groep. De bepaling van deze groep werd ook in dit geval ernstig gestoord door de aanwezigheid van onbekende substanties, o.a. Y_a en Y_b .
- e. een verschil met de andere carcinoompatienten is de hoog-normale excretie van aldosteron.
- f. bij vergelijking van de som van de individueel bepaalde 17-hydroxy-steroiden met de als groep bepaalde 17-hydroxy-steroiden valt een zeer sterke discongruentie op: slechts 6% komt voor rekening van de F-groep+S-groep. In dit opzicht is de overeenkomst met de patienten M. -F. en Sche. onmiskenbaar.

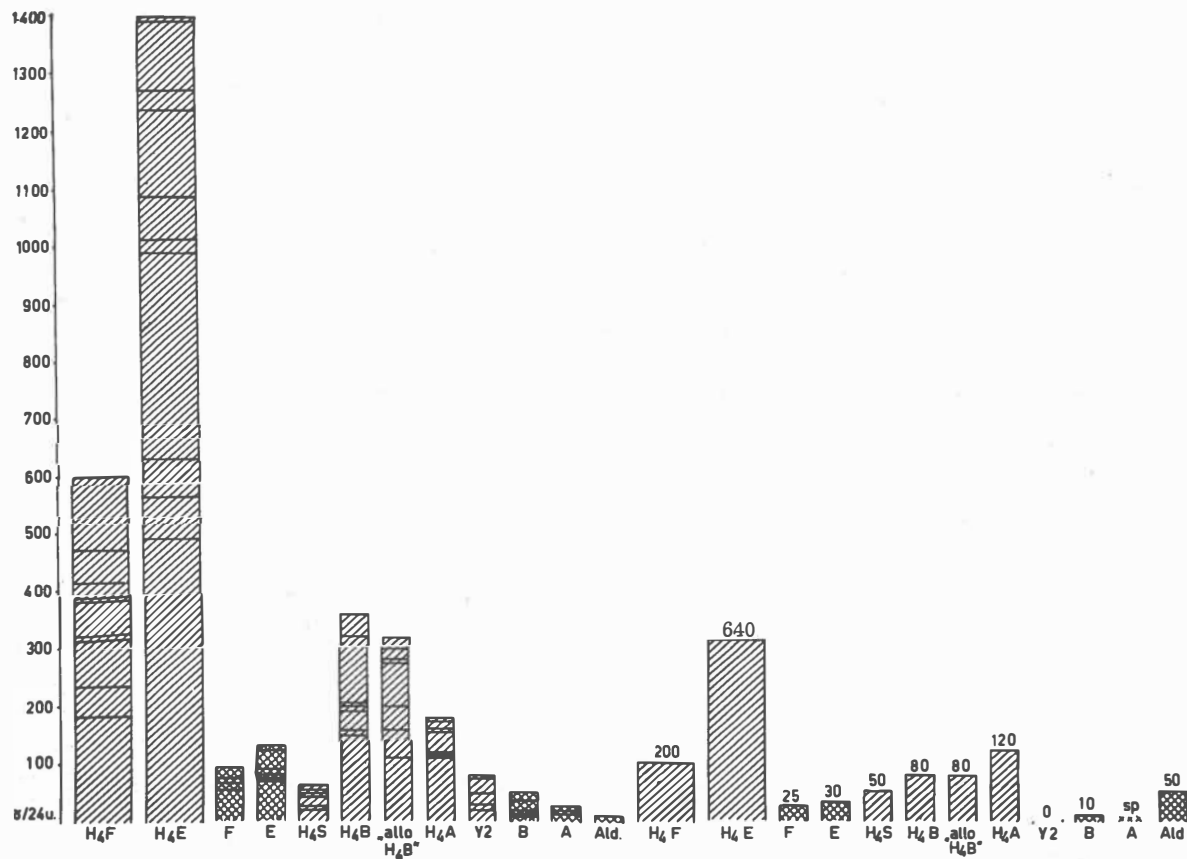
Verschillende karakteristika van de spectra van de patienten met bijniercarcinoom enerzijds en van de patienten met een benigne adrenogenitaal syndroom anderzijds, zijn dus terug te vinden in het spectrum van dit patientje met een adrenogenitaal syndroom veroorzaakt door een metastaserend bijniercarcinoom.

3. Syndroom van Conn.

Overzichtstabel; tabel X.

33. Patiente E. -v.d. L., 58 jaar. Diagram 9.

Symptomen: matige hypertensie sinds 1946 (150/80 - 205/110), retinopathia hypertonica; serum Na 149-158 maeq/



1., serum K 2,35-3,1 maeq/l; metabole alkalose; normo-calcaemische tetanie; polyurie, albuminurie, gestoord concentratievermogen (max. concentratie 1016), onvermogen tot produceren van zure urine; uitwisselbaar Na 33,9 maeq/kg, uitwisselbaar K 25,8 maeq/kg, Na/K-ratio dus duidelijk pathologisch (normaal 0,9); onvermogen tot adequate terugresorptie van K door de niertubuli, zoals bij balans-onderzoek werd vastgesteld.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 11,0 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 8,9 mgr/24 uur.

Anatomische diagnose: adenoom van 6 g in de linker bijnierschors.

Post-operatief verdwenen de biochemische afwijkingen volkomen en werd de bloeddruk normaal.

De klinische diagnose werd bevestigd door de aanwezigheid van 48 μ g aldosteron in de 24 uren urine, bepaald volgens de gemodificeerde methode van Neher en Wettstein.

De verhoogde excretie van aldosteron werd ook vastgesteld bij de spectrum-bepaling: volgens ruwe schatting $\pm 20 \mu$ g/24 uur. Uit het spectrum blijkt verder de zeer lage excretie van de andere hormonen en hun metaboliëten; de F/B-ratio is laag. De excretie van aldosteron bedroeg een week post-operatief 2 μ g/24 uur.

34. Patiente M. -U., 45 jaar.

Diagnose: hyperaldosteronisme (syndroom van Conn ?). In verband met de moeilijke interpretatie van het klinische beeld en de laboratoriumgegevens volgt een uitvoerig overzicht van de ziektegeschiedenis.

Anamnese: patiente zou ten tijde van de eerste partus op 16-jarige leeftijd een "nieraandoening" hebben gehad en moest gedurende de vier volgende graviditeiten zoutloos dieet gebruiken wegens tensieverhoging. Ze zou herhaaldelijk een nierbekkenontsteking hebben gehad. Beide ouders overleden na een apoplexie. De laatste jaren had ze last van hoofdpijn en duizeligheid; ze was gauw moe en kortademig. De visus ging geleidelijk achteruit; vlak voor opname ontstond een passagere linkszijdige hemiparese. De geconsulteerde internist constateerde een ernstige hypertensie die niet reageerde op antihypertensie-therapie met ganglionblokkerende middelen.

Onderzoek: magere vrouw met uitgesproken arteriosclerose. Tensie 300/145. Fenomeen van Trousseau positief. Aan hart, longen en buikorganen werden bij fysisch onderzoek geen afwijkingen vastgesteld. Oogfundus: chorioïdea-sclerose met spastische arterien. Thorax-doorlichting: brede, kromme aorta. ECG: links-strain. Bij intraveneuze pyelografie werden de urine-afvoerwegen nauwelijks zichtbaar.

TABEL X- Patienten met een (mogelijk) syndroom van Conn - TABLE X- Patients with (possible) Conn's syndrome

No case	Naam Name	Diagnose Diagnosis	H ₄ F	H ₄ E	"allo- H ₄ F"	"U"	E	F	H ₄ S	S	H ₄ B	"allo- H ₄ B"	H ₄ A	A	B	Ald.	H ₄ F H ₄ E	F/E	Totaal F	Totaal B	F/B	% mediff.s
33	E. - v. d. L.	Adenoma	200	640	-	20	30	25	50	-	80	80	120	0	10	48 (2)	0,3	0,8	915	290	3,1	5,3
34	M. - U.	Hyperpl.	400	600	100	20	80	70	40	-	150	160	100	5	30	40(18:25) (30)	0,7	0,9	1270	445	2,7	3,1
35	B. - B.	"	400	1440	-	10	75	40	40	-	280	60	240	0	10	10;15	0,3	0,5	1965	590	3,3	2,0
36	S. - N.	?	440	960	-	15	60	50	100	-	160	140	120	5	20	6	0,5	0,8	1525	445	3,4	6,2
37	v. H. - E.	?	±500	±1200	-	20	±100	70	±100	-	200	-	85	10	35	4;10	0,4	0,7	±1900	330	±5,8	±5,0
38	L. - D.	?	800	1440	240	10	90	45	20	-	90	100	80	0	10	11	0,6	0,5	2625	280	9,3	0,8
39	Fa.	Hyperpl. (post op.)	560	2100	-	25	135	90	90	-	160	90	200	0	20	6	0,3	0,7	2910	470	6,1	3,0

Laboratorium-onderzoek: normaal bloedbeeld. Urine: 1 ‰ eiwit, reductie negatief; sediment: \pm 15 leucocyten en + 2 erythrocyten per gezichtsveld, geen cylinders; reactie zuur. Nierfunctie: diurese 2-3 l per dag; concentratie maximaal 1014; v. Slyke 45% van 54 bij een bloedureum van 0,85 g/l; Rowntree: 27%. Serum-electrolyten: Na 136,5 maeq /l, K 2,28-2,65 maeq /l, Cl 89-103 maeq /l, Ca 10,7 mgr%, P 2,5 mgr%. Alkalireserve 60,5-62,4 vol. %.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 7,7 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 6 mgr/24 uur.

Op grond van de hypertensie, de polyurie met gestoord concentratievermogen, de hypokalaemische alkalose en de normo-calcaemische tetanie werd de mogelijkheid van een Conn's syndroom overwogen.

Een aldosteron-excretie van 40 μ g/24 uur wees inderdaad op het bestaan van hyperaldosteronisme, maar aan de primaire aard hiervan moest worden getwijfeld op grond van de uraemie en een mogelijk primair nierlijden in de anamnese. Bovendien bleek bij balans-onderzoek dat patiënte niet in staat was om Na afdoende te retineren tijdens een streng zoutloos dieet.

Er zou dus sprake kunnen zijn van een "salt-losing" nephritis met secundair hyperaldosteronisme, zoals o.a. beschreven in een recent artikel van Stanbury en Mahler (1959). In de veronderstelling dat de aldosteron-excretie in dat geval na enkele dagen zoutbelasting tot de norm zou moeten dalen, werd de diagnose afhankelijk gesteld van een aldosteronbepaling aan het eind van een vierdaagse periode waarbij per dag in totaal \pm 15 g NaCl werd toegediend met de voeding. Twee keer werd deze procedure gevolgd en in beide gevallen bleek de aldosteron-excretie nog aanzienlijk boven normaal te liggen: resp. 18 en 25 μ g/24 uur. Een pathologische bijnierfunctie leek dus zeer waarschijnlijk en gezien het feit dat de prognose van de hypertensie, zelfs op korte termijn, als zeer ernstig moest worden beschouwd, werd tot operatie besloten.

De linker bijnier van 10 g werd totaal geëxtirpeerd, van de rechter bijnier werd 2,6 g weggenomen. Post-operatief trad geen enkele verbetering op: de tensie werd nog hoger, de uraemie nam toe, de polyurie bleef bestaan en de aldosteron-excretie bleef te hoog (30 μ g/24 uur). Patiënte kreeg pijn in de linker zij en overleed twee weken na de operatie.

Bij obductie werd een verse thrombose in de linker arteria renalis vastgesteld en een nephrocirrhosis arterioloscle-

rotica levis, rechts meer uitgesproken dan links. Bovendien werd van de rechterbijnier nog een rest van 15 g aangetroffen, waarmee de hoge post-operatieve aldosteron-excretie was verklaard. Microscopisch werd een bijnierschors-hyperplasie vastgesteld met nodulaire structuren; de cellen van alle schorslagen waren zeer lipoid-rijk.

Zowel het bijniergewicht (totaal \pm 29 g) als dit microscopisch beeld komen overeen met de bijnierafwijkingen in de gevallen van "salt-losing" nephritis die Stanbury uit de literatuur heeft verzameld. Men zou het beschreven ziektebeeld dus kunnen beschouwen als een geval van secundair hyperaldosteronisme tengevolge van chronisch zoutverlies via primair beschadigde nieren. Hierbij moet dan worden aangenomen dat een continue prikkel tot aldosteron-productie op den duur kan leiden tot een hyperplasie met adenoomvorming, die min of meer autonoom kan gaan functioneren (Ross c. s. 1958).

Niet in overeenstemming met de diagnose "salt-losing" nephritis is het feit dat de Na-balans van onze patiënte pas negatief werd tijdens een periode van extreme zoutbeperking. Bij de gevallen uit de literatuur was het renale zoutverlies nl. zo groot dat de patienten vaak de indruk maakten in een Addison-crise te verkeren! Op grond van dit grote verschil in het klinische beeld werd de diagnose "salt-losing" nephritis verworpen.

Een omstandigheid die ons toch weer doet aarzelen in dit geval de diagnose Conn's syndroom te stellen, is het feit dat steeds meer gevallen worden beschreven van maligne hypertensie, gepaard gaande met biochemische afwijkingen als bij primair hyperaldosteronisme, een hoge aldosteron-secretie of-excretie en een min of meer duidelijke bijnierhyperplasie (Laragh, 1960; Laidlaw, 1960).

Laragh vond dit beeld bij 14 van de 15 onderzochte patienten met maligne hypertensie en rekent deze gevallen niet tot het Conn's syndroom. Deze naam wil hij reserveren voor gevallen waarbij een dergelijk biochemisch patroon samengaat met een niet-maligne hypertensie en een bijnierafwijking, waarvan de primaire aard minder dubieus is (aldosteron-producerend adenoom).

Een causale rol van aldosteron bij het ontstaan van de maligne fase van de hypertensie wordt overigens niet ontkend en zelfs waarschijnlijk geacht; alleen het ontstaan van de aldosteron-producerende hyperplasie wordt secundair geacht aan een niet gedefinieerde nierbeschadiging (Laragh) of aan een unilaterale thrombose van de arteria renalis (Laidlaw).

Het valt buiten het kader van dit proefschrift uitvoeriger in te gaan op de grote moeilijkheden die telkens weer worden ondervonden bij de interpretatie van klinische en biochemische gegevens in gevallen van primair en secundair hyperaldosteronisme. De ziektebeelden zijn nog steeds niet scherp omschreven en de theorieën over de pathogenese lopen ver uiteen.

wij zijn van mening dat wij rekening mogen houden met de mogelijkheid dat de bijnierschorsafwijkingen van patiente M.-U. primair kunnen zijn en de nierafwijkingen secundair aan een hyperaldosteronisme dat jarenlang heeft bestaan.

Uit het spectrum blijkt een geringe excretie van de F-groep en een lage F/B-ratio; de verhoogde excretie van aldosteron werd ook bij de spectrum-bepaling vastgesteld.

35. Patiente B.-B.; 49 jaar.

Diagnose: hyperaldosteronisme (syndroom van Conn?).
Symptomen: hypertensie (245/145), retinopathia hypertonica; serum Na 140-150 maeq/l, serum K 2,7-3,3 maeq/l; metabole alkalose; normo-calcaemische tetanie; max. urine-concentratie 1022; negatieve K-balans, te corrigeren met de aldosteron-antagonist SC 9420; lichte diabetes mellitus.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 7,1-9,1 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 12,8-9 mgr/24 uur.

Anatomische diagnose: dubbelzijdige bijnierhyperplasie (totaal bijniergewicht 16 g) met adenoom-achtige formaties in de zona fasciculata en een brede, celrijke zona glomerulosa.

Patient overleed enkele uren na de operatie.

De aldosteron-excretie is relatief te hoog: 10 en 15 μ g/24 uur. Dergelijke waarden kunnen worden gevonden bij gezonde personen, maar het serum K is dan normaal; wanneer het serum K bij personen met normale bijniere door extra-adrenale factoren daalt, wordt de aldosteronsecretie geremd en vindt men een lage aldosteron-excretie. Een hoog-normale aldosteron-excretie in combinatie met een laag serum K mag daarom als pathologisch worden beschouwd (Garrod c.s., 1956). Bij de spectrum-bepaling werd geen aldosteron aangetoond; wel weer een laag-normale excretie van de F-groep en een verlaagde F/B-ratio.

De interpretatie van het ziektebeeld stuit op vrijwel dezelfde moeilijkheden als boven beschreven (vgl. Laragh c.s., 1960).

36. Patiente S.-N., 49 jaar.

Observatie syndroom van Conn in verband met matige hypertensie (180/90-220/110); serum Na 143,4 maeq/l, serum K 2,6-2,2 maeq/l; normo-calcaemische tetanie; polyurie, polydipsie, geringe albuminurie, max. urine-concentratie 1020; na toediening van de aldosteron-antagonist

SC 9420 toename van de Na-excretie; echter geen paradoxale Na-diurese na toediening van cortison.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 11, 1-16, 2 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 16, 6-14, 3 mgr/24 uur.

Mede op grond van een "normale" aldosteron-excretie ($6 \mu\text{g}/24$ uur) werd patiënte niet geopereerd. Het bestaan van een hyperaldosteronisme is dus niet bewezen, maar ook niet uitgesloten. De eenmalige aldosteronbepaling werd nl. gedaan nadat aan patiënte gedurende tien dagen een extra hoeveelheid van 5 g NaCl per dag werd toegediend. Een dergelijke belasting met zout is bij normalen in staat om de secretie van aldosteron tot een minimum af te remmen. Een aldosteron-excretie van $6 \mu\text{g}$ in combinatie met een laag serum K en een overmatige zouttoevoer mag men dus niet zonder meer als normaal beschouwen.

Het spectrum toont grote overeenkomst met het excretie-patroon van de drie voorgaande patienten uit deze groep: de excretie van de F-groep is laag en de F/B-ratio is gedaald. Op grond van deze overwegingen lijkt het gewenst dit geval opnieuw te beoordelen.

37. Patiënte v. H. -E., 63 jaar.

Observatie mineralocorticoid-exces-syndroom.

Patiënte had sinds 25 jaar progressieve spieratrofie en sinds 5 jaar lichte diabetes mellitus en hypertensie (160/70-250/125); serum Na 140 maeq/l, serum K 2,8 maeq/l; alkalireserve 50 vol. %; geen afwijkingen in de urine, max. concentratie 1021; de K-balans was in geringe mate negatief; met cortison kon een paradoxale Na-excretie worden opgewekt; de aldosteron-antagonist SC 8109 had geen effect.

Na retroperitoneale luchtinsufflatie werd röntgenologisch een tumor boven de linkernier aangetoond, die werd opgevat als een aldosteron-, eventueel corticosteron-producerende bijnier tumor.

Bij de operatie bleek deze tumor een niercyste te zijn. De bijnier aan deze kant leek normaal; de rechter bijnier werd niet geïnspecteerd.

In eigen laboratorium werd een aldosteron-excretie vastgesteld van $4 \mu\text{g}/24$ uur, bij een tweede bepaling $10 \mu\text{g}/24$ uur; in het laboratorium van Neher en Wettstein werd $5 \mu\text{g}/24$ uur gevonden. De excretie van de F-groep is laag-normaal; de F/B-ratio is normaal.

Wij hebben geen verklaring voor de biochemische afwijkingen. Hetgeen reeds eerder over de betrekkelijkheid van een aldosteronbepaling werd gezegd, is ook van toepassing op deze patiënte. Aangezien de rechter bijnier bij de operatie niet werd beoordeeld, is ook hier een verband met een bijnierschorsafwijking niet geheel uitgesloten.

38 . Patiente L. -D., 40 jaar; mobiel.

Observatie syndroom van Conn in verband met ernstige hypertensie (260/140); Cushing-uiteindelijk; serum Na normaal, serum K 2-3 maeq/l; normale glucose-belastings-curve.

Excretie van 17-hydroxy-steroiden 6,6 mgr/24 uur, van 17-oxo-steroiden 9,7 mgr/24 uur.

Het poliklinisch bepaalde spectrum toont een vrij geringe excretie van de B-groep en een wat hoge F/B-ratio. De aldosteron-excretie is hoog - normaal.

Het is niet mogelijk met behulp van alleen deze gegevens een uitspraak te doen omtrent de bijnierschorsfunctie. Klinische observatie zal nodig zijn om na te gaan welke betekenis aan de hoog-normale aldosteron-excretie mag worden toegekend.

39 . Patient Fa., 21 jaar; mobiel.

Diagnose: status na subtotale bijnierextirpatie wegens syndroom van Conn ten gevolge van hyperplastische bijniere (van Buchem c.s., 1956). Patient was drie jaar post-operatief geheel klachtenvrij en bij een klinische observatie kon geen enkele afwijking meer worden vastgesteld.

De steroid-excretie is eveneens volkomen normaal.

Samenvattend kan van deze groep patienten worden gezegd dat in drie gevallen (E. v. d. L ; M. -U. ; B. -B.) een verhoogde excretie van aldosteron werd gevonden die bleek te berusten op een onmiskenbare bijnierschorsafwijking.

Wij zijn van mening dat in het eerste geval de diagnose syndroom van Conn (primair hyperaldosteronisme) met zekerheid mag worden gesteld. In de twee andere gevallen is wel zoveel reden voor twijfel aan de primaire aard van het hyperaldosteronisme, dat wij geen definitieve uitspraak kunnen doen. De mogelijkheid dat ook deze patienten hebben geleden aan een syndroom van Conn is niet uitgesloten.

De excretie van de andere schorshormonen en hun metaboliëten is bij alle drie patienten duidelijk gedaald en wel des te meer naarmate de aldosteron-excretie groter is. Dit maakt de indruk alsof de behoefte aan glycocorticoïde hormonen kleiner is als er een overmaat aldosteron wordt geproduceerd.

De productie van B lijkt minder sterk geremd dan die van F en de F/B-ratio is diensgevolge verlaagd. De correlatie tussen een lage F/B-ratio en een verhoogde aldosteron-excretie, die in de gevallen van fysiologisch secundair hyperaldosteronisme werd opgemerkt, komt dus ook hier tot uiting.

Van praktisch belang is de vraag of de lage excretie van de F-groep en de lage F/B-ratio van diagnostische waarde kunnen zijn bij de beoordeling van dubieuze gevallen van het syndroom van Conn. Op grond van deze speculatie zou men patiente S. -N. binnen de groep van het syndroom van Conn willen plaatsen en de overige patienten erbuiten.

TABEL XI- Patienten gestimuleerd met exogeen ACTH.

TABLE XI- Patients stimulated with 8 hour infusions of ACTH (25 mg daily, during 1 or 2 days)

No case	Naam Name	Stimulatie Stimulation	H ₄ F	H ₄ E	"allo-H ₄ F"	"U"	E	F	H ₄ S	S	H ₄ B	"allo-H ₄ B"	H ₄ A	A	B	DOC	Ald.	H ₄ F H ₄ E	F/E	Totaal F	Totaal B	F/B	% gediff.S
8	S.-D.	Basaal Basal	640	960	140	10	90	55	20	-	125	160	40	5	20	-	4	1,7	0,6	1900	350	5,4	1,1
8 ^a	"	ACTH 1e dag 1st day	3500	2240	960	-	280	1280	200	-	1600	3200	480	160	240	-	6	1,6	4,6	8260	5680	1,5	2,4
8 ^b	"	ACTH 2e dag 2nd day	7680	5120	2560	-	520	3200	800	-	2100	3200	960	120	320	-	3	1,5	6,0	19080	6700	2,8	4,0
28	v.d.H.	Basaal Basal	900	3840	-	25	165	140	35	-	155	200	110	30	50	-	8	0,2	0,9	5070	545	9,3	0,7
28 ^a	"	ACTH 1e dag 1st day	9000	9000	-	-	500	1900	500	320	2300	1900	800	120	240	-	14	1,0	3,8	20400	5360	3,8	3,9
28 ^b	"	ACTH 2e dag 2nd day	9000	9000	-	-	400	1900	800	-	1900	1900	1200	160	220	-	7	1,0	4,8	20300	5380	3,8	3,8
13	D.	Basaal Basal	640	640	-	240	400	440	125	-	80	80	120	160	240	-	135	1,0	1,1	2360	680	3,1	5,6
13 ^a	"	ACTH	3200	960	-	320	640	1920	960	80	1600	1120	800	1920	1280	60	625	3,3	3,0	7040	6720	1,0	13,4
34	M.-U.	Basaal Basal	400	600	100	20	80	70	40	-	150	160	100	5	30	-	40	0,7	0,9	1270	445	2,7	3,1
34 ^a	"	ACTH	4800	2240	-	80	440	1750	800	-	2560	960	640	200	320	-	72	2,1	4,0	9310	4680	2,0	8,0
23	R.	Basaal Basal	320	280	-	5	25	30	100	-	20	5	10	0	sp	-	3	1,1	1,2	660	35	18,7	3,2
23 ^a	"	ACTH 1e dag 1st day	800	560	40	20	80	100	300	-	90	35	25	5	30	-	3	1,4	1,2	1600	185	8,5	16,0
23 ^b	"	ACTH 2e dag 2nd day	1600	960	160	20	120	120	800	20	200	50?	100	10	25	-	7½	1,7	1,0	2980	385	7,7	22,0
20	L.	Basaal Basal	640	1280	150	10	45	30	300	-	50	35	45	0	10	-	0	0,5	0,7	2155	140	15,3	12,3
20 ^a	"	ACTH 1e dag 1st day	360	1520	150	15	25	30	240	-	60	40	60	0	10	-	0	0,2	1,2	2100	170	12,3	10,3
20 ^c	"	ACTH 2e dag 2nd day	240	1120	100	10	40	30	280	-	50	40	40	0	10	-	0	0,2	0,7	1540	140	11,0	15,5

In de literatuur zijn twee gevallen van hyperaldosteronisme beschreven waarbij de steroid-excretie uitvoerig is nagegaan. Baulieu c.s. (1959) vonden in een typisch geval van het syndroom van Conn, tengevolge van een adenoom, op twee achtereenvolgende dagen de volgende waarden ($\mu\text{g}/24$ uur):

H_4F 200-270, H_4E 400-450, allo- H_4F 35-65, $\text{F} \pm 10$, $\text{E} \pm 20$, H_4S 20-85, H_4B 40-100, allo- H_4B 60-85, H_4A 40-?, $\text{B} \pm 5$, ald. 11-25, $\text{F/B-ratio} \pm 4, 8 \pm 3, 4$.

Dit spectrum is vrijwel identiek met dat van patiente E. -v.d. L. Genest c.s. (1960) vonden in een geval van maligne hypertensie met microscopisch abnormale bijnieren (te brede zona glomerulosa) de volgende waarden ($\mu\text{g}/24$ uur):

H_4F 1428, H_4E 1221, F 31, E 63-192, H_4S 33, ald. 26-51. De hoge H_4F -excretie contrasteert met onze bevindingen.

I. Patienten met geïnduceerde hyperfunctie van de bijnierschors.

1. Stimulatie met exogeen ACTH.

Overzichtstabel; tabel XI.

Bij zes van de reeds besproken patienten werden steroidbepalingen verricht na stimulatie van de bijnierschors met ACTH. In alle gevallen werd gedurende de eerste acht uur van het etmaal, waarover de urine werd verzameld, 25 mgr cortrophine (Organon) per i.v. infuus toegediend; in vier gevallen werd dit de volgende dag herhaald.

Aangenomen mag worden dat tenminste 80% van de sterk gestegen dagproductie nog met de urine van dezelfde dag wordt uitgescheiden (blz. 26); een eventuele stijging in de excretie op de tweede stimulatie dag mag dus worden beschouwd als een gevolg van een verdere stijging in de productie.

De studie betreft de volgende patienten:

S.-D.: normale bijnierfunctie (fig. 4).

D.: levercirrhose.

v.d.H.: syndroom van Cushing?, bijnierhyperplasie? (fig. 5).

M.-U.: syndroom van Conn?, bijnierhyperplasie.

R.: secundaire bijnierinsufficiëntie, bijnieratrofie? (fig. 6).

L.: primaire bijnierinsufficiëntie; bijnier tuberculose.

De spectra (die van patient L. uitgezonderd) geven aanleiding tot de volgende beschouwingen:

- a. de krachtige stimulering van de bijnierschorsactiviteit komt tot uiting in een toename van de steroid-excretie die alle hormonen en alle metabolieten betreft en die in vrijwel alle gevallen een veelvoud van de basale waarde bedraagt.

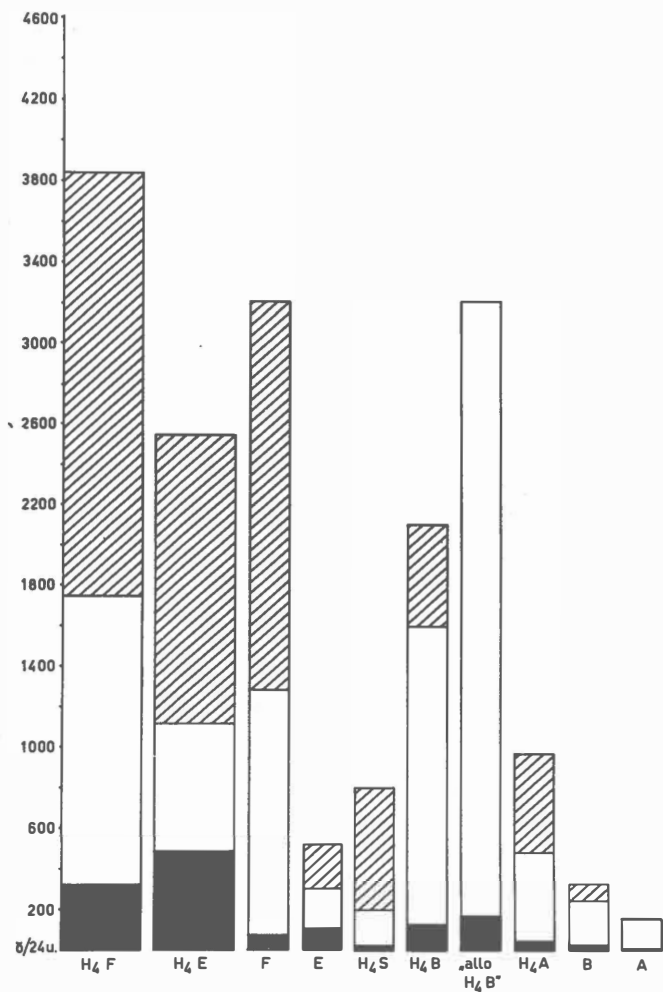


fig. 4. Invloed van ACTH (25 mgr i. v. dd) op de steroïd-excretie van pat. S. -D. (normale bijnieren).

response of normal adrenals to ACTH-stimulation, 25 mg a day i. v. (case 8).

basale excretie
 basal excretion

toename op 1e dag
 increase on 1st day

toename op 2e dag
 increase on 2nd day

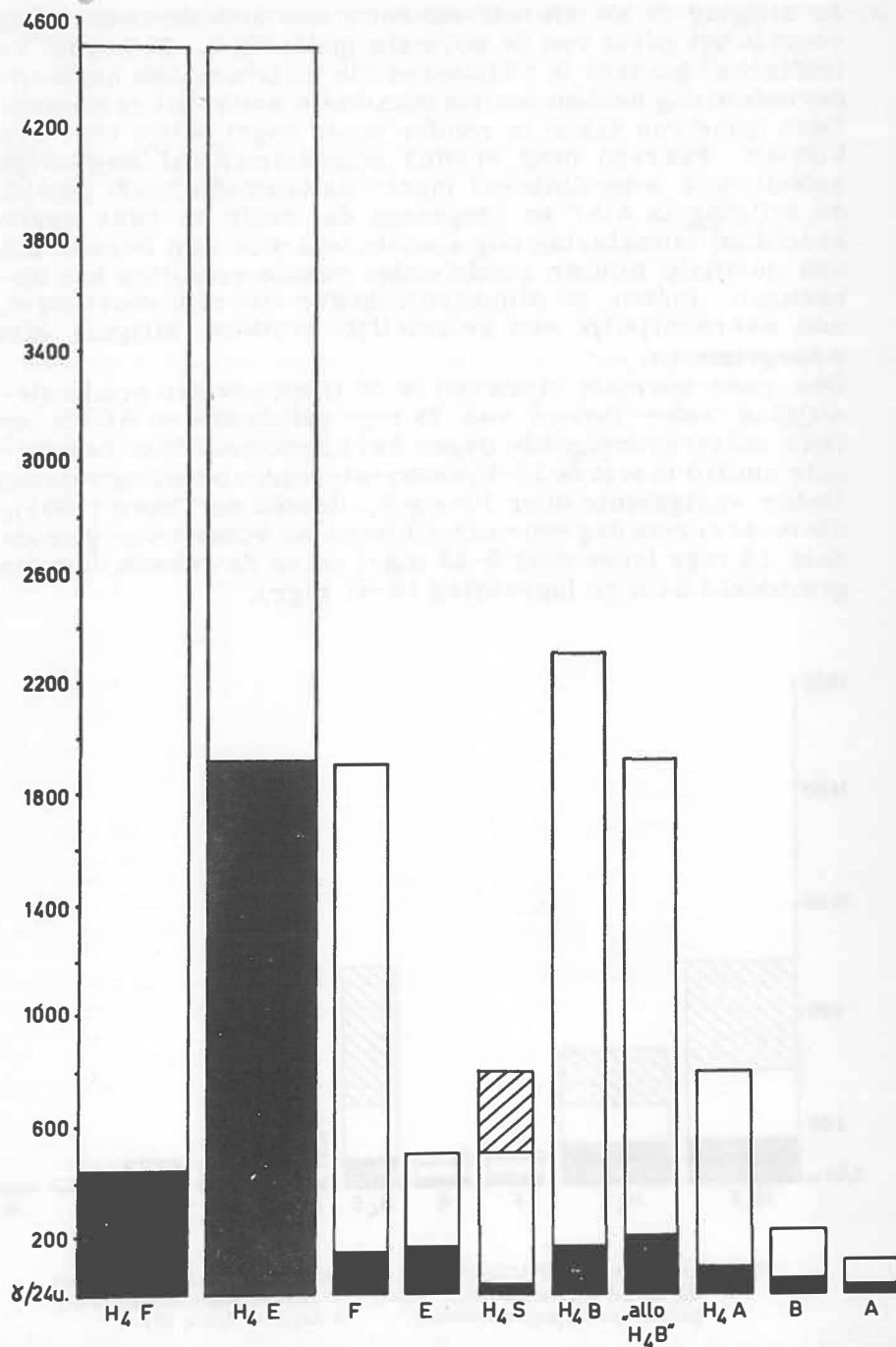


fig. 5. Invloed van ACTH (25 mgr i. v. dd) op de steroid-excretie van pat. v.d.H. (hyperplasie?).

Reponse of hyperplastic? adrenals to ACTH-stimulation, 25 mg a day i. v. (case 28).

- b. de stijging in de steroid-excretie van zich de tweede dag voort in het geval van de normale (patiente S. -D.) en de "atrofische" (patient R.) bijniere die blijkbaar een aanloopperiode nodig hebben om tot maximale activiteit te komen. Deze gang van zaken is zonder meer begrijpelijk voor een bijnier, waarvan mag worden aangenomen dat langdurige subnormale stimulatie tot inactiviteitsatrofie heeft geleid; de stijging is hier zo langzaam dat zelfs na twee dagen krachtige stimulering nog slechts waarden zijn bereikt die een normale bijnier reeds onder basale condities kan opbrengen. Indien de stimulatie langer zou zijn voortgezet, zou waarschijnlijk een geleidelijke verdere stijging zijn waargenomen.

Ook voor normale bijniere is de trapsgewijze productie-stijging onder invloed van 25 mgr geïnfundeed ACTH op twee achtereenvolgende dagen het karakteristieke reactiepatroon. Dit is met de 17-hydroxy-steroidenbepaling volgens Reddy vastgesteld door Froesch, Renold en Thorn (1959), die op de eerste dag een excretietoename vonden van gemiddeld 14 mgr (spreiding 5-25 mgr) en op de tweede dag van gemiddeld 24 mgr (spreiding 15-41 mgr).

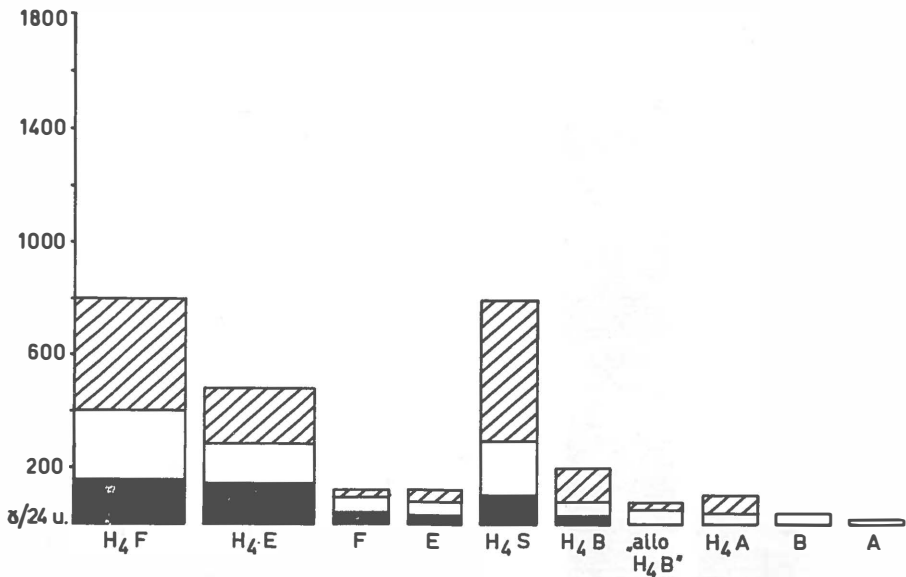


fig. 6. Invloed van ACTH (25 mgr i. v. dd) op de steroid-excretie van pat. R. (panhypopituitarisme).

Response of atrophic adrenals to ACTH-stimulation, 25 mg a day i. v. (case 23).

Het is in dit verband opvallend dat bij patient v.d.H. reeds op de eerste dag een zeer hoge steroid-excretie optrad die op de tweede dag niet werd overschreden. Men krijgt de indruk dat de bijniere in dit geval als het ware klaar hebben gelegen om ogenblikkelijk en maximaal op de prikkel te reageren.

Gecombineerd met de hoog-normale excretie onder basale omstandigheden wijst dit o.i. in de richting van een bijnier-hyperplasie.

- c. van de F-metabolieten is over het algemeen de procentuele excretietoename van $H_4 F$ het grootst en in alle gevallen is de $H_4 F/H_4 E$ -ratio duidelijk toegenomen. Dit is in overeenstemming met waarnemingen van anderen (Baulieu c.s., 1957; Gold c.s., 1959; Gallagher, 1960) en wijst op het belang van de reactie $F \rightarrow H_4 F$ voor een snelle eliminering van een overmaat F. Uit de spectra van patiente S.-D. blijkt dat ook de omzetting $F \rightarrow \text{allo-}H_4 F$ in dit opzicht belangrijk is. Zoals te verwachten, is de F/E-ratio in vrijwel alle gevallen aanzienlijk gestegen.

- d. zonder uitzondering is de excretie van $H_4 S$ opvallend sterk toegenomen; de procentuele stijging is zelfs groter dan van de F-metabolieten.

Dit is een aanwijzing dat tijdens massale synthese en secretie van F ook het onvoltooide hormoon in versterkte mate aan het bloed wordt afgegeven (par. K).

In enkele gevallen is de secretie van S blijkbaar zozeer toegenomen dat het steroid als zodanig in meetbare hoeveelheden wordt uitgescheiden:

1. patient v.d.H., alleen de eerste dag (maximale F-secretie).

Met deze urine werden twee bepalingen uitgevoerd, een keer met en een keer zonder de aanvullende hydrolyse met zoutzuur.

De excretie van S werd bij de routine-bepaling (met aanvullende hydrolyse) aanzienlijk hoger gevonden: $320 \mu g$ tegenover $40 \mu g/24$ uur.

Een fout bij de bepaling is niet uitgesloten; het verschil zou echter ook kunnen samenhangen met het verschil in de gevolgde procedure. In ieder geval is deze bevinding voor ons aanleiding geweest het principe van de aanvullende hydrolyse met zuur niet te verlaten, temeer daar ook weer uit dit voorbeeld blijkt dat de lagere pH de opbrengst van de steroiden niet ongunstig beïnvloedt. Op de tweede stimulatiedag werd geen S meer aangetoond; snellere metabolisering door betere adaptatie van de lever aan de vergrote toevoer van steroiden kan dit misschien verklaren.

TABEL XI^a

Excretie van corticosteroiden ($\mu\text{g}/24$ uur) na stimulatie met ACTH
Literatuur-overzicht

	H ₄ F	H ₄ E	F	E	H ₄ S	H ₄ B	allo-H ₄ B	H ₄ A	B	A	ACTH-dosering
Cope en Hurlock	1180-5500	1630-7150	251-1820	-	-	-	-	-	-	-	100 mgr d1
Richardson c.s.	1100-4000	1700-2500	1100-1200	400-500	260	1340-1800	600-1700	900-1400	80-120	100-150	10 mgr in 8 uurs infuus
	2400	3300	2400	-	-	-	-	-	-	-	20 mgr in 8 uurs infuus
Gold c.s.	12300-50600 (+allo-H ₄ F)	6100-24900	-	-	-	-	-	-	-	-	25 mgr in 8 uurs infuus
Baulieu en Jayle	1700-3750	3000-15000	700-1200	70-240	-	-	-	-	-	-	2 x 40 mgr i.m.
	12000	18000	5000	250	-	-	-	-	-	-	25 mgr in 8 uurs infuus (Cushing patient)
Peterson en Pierce (1960)	22000	10000	2000	-	-	4000	5200	1000	310	-	4 mgr/uur in 36 uurs infuus

2. patient D.

De combinatie van een sterk toegenomen secretie en een zeer onvoldoende metabolisering heeft geleid tot de excretie van 80 μ g S.

3. patient R.

Op de tweede stimulatiedag werd 20 μ g S gevonden.

Deze hoeveelheid was te gering voor rechromatografie in een derde systeem; er is dan ook enige reden voor twijfel ten aanzien van de identiteit.

e. de substantie Y_2 , die in overmaat werd aangetoond in de urine van de patienten J.-A. en M. (bijniercarcinoom) en de patienten Sche. en v. T. (adrenogenitaal syndroom), blijkt onder invloed van ACTH niet in versterkte mate te worden uitgescheiden. Dit is een reden te meer om aan te nemen dat hier geen sprake is van een metaboliet van F of B.

f. de procentuele stijging van de B-groep is in alle gevallen op de eerste stimulatiedag aanzienlijk groter dan die van de F-groep, met als gevolg dat er op de eerste dag een aanzienlijke daling van de F/B-ratio optreedt. Deze scherpe daling zet op de tweededag niet door. Bij de patiente met normale bijniereen is zelfs al een terugkeer tot normale verhoudingen aangeduid, voortvloeiend uit een achterblijven van de excretie der B-groep bij de doorgaande excretie van de F-groep. In paragraaf J zal deze waarneming nader worden besproken.

g. vrijwel zonder uitzondering is de excretie van aldosteron op de eerste stimulatiedag iets gestegen.

Deze waarneming is in overeenstemming met de algemene opvatting dat de aldosteronsecretie wel in grote mate, maar niet volkomen onafhankelijk is van de hypophyse (Crabbé c. s. 1959).

De water- en zoutretentie, op de eerste dag tot stand gebracht door de grote hoeveelheden F en vooral B, werkt remmend op de aldosteronsecretie en doorbreekt het effect van de ACTH-prikkel. Reeds op de tweede dag is de aldosteron-excretie dan ook weer gedaald tot beneden de basale waarde.

Opvallend is de 5-voudige stijging van de aldosteron-excretie bij patient D. Dit wekt de indruk alsof bijniereen, waarvan de activiteit reeds speciaal is gericht op de productie van een bepaald hormoon (aldosteron in dit geval), op een ACTH-prikkel een maximale prestatie leveren (vgl. de maximale F-productie bij patient v. d. H.). De vertraagde metabolisering van aldosteron zal zeker ook hebben bijgedragen tot deze hoge excretie.

- h. Bij patient D. menen wij na ACTH-stimulatie DOC te hebben gevonden.

Met uitzondering van patiente J. -A. (gemetastaseerd bij-niercarcinoom) hebben wij bij geen enkele van de besproken normale personen en patienten ook maar de geringste aanweziging gevonden voor de aanwezigheid van DOC in de urine. Bij patiente J. -A. werd na de eerste chromatografische scheiding een BT-positieve, F1-positieve substantie waargenomen ter hoogte van het referentie-steroid DOC (fractie III/III); bij de tweede scheiding echter bleek de Rf-waarde ten opzichte van authentiek DOC 0,9 te zijn en bestond een sterke discongruentie tussen de BT- en de F1-reactie. Om deze redenen leek ons identiteit van de onbekende substantie met DOC dubieus.

De substantie uit de urine van patient D. daarentegen had bij de tweede scheiding precies dezelfde Rf-waarde als authentiek DOC. De hoeveelheid was te gering voor rechromatografie in een derde systeem.

Van patient D. stond bij voorbaat reeds vast, dat de kans op het vinden van DOC in de urine groter was dan ooit, dank zij de combinatie: krachtige stimulering van bijniere die reeds onder basale condities grote hoeveelheden mineralocorticoiden produceerden en een zwaar beschadigde lever, waardoor snelle afbraak onmogelijk werd. Tenslotte kan onze mening nog aanzienlijk steun krijgen, indien mocht blijken dat de geïsoleerde substantie Z_2 ($320 \mu\text{g}$) identiek is met H_4 DOC (vgl. blz. 62).

Uit de spectra van patient L. blijkt duidelijk dat de bijniere in dit geval niet op de ACTH-stimulatie hebben gereageerd. Dit is begrijpelijk want de intacte resten van deze bijniere leveren reeds een maximale prestatie onder invloed van endogeen ACTH; van een stimulatie met exogeen ACTH kan dan ook geen effect meer worden verwacht (vgl. par. K).

In tabel XI^a zijn ter vergelijking de gegevens uit de literatuur samengevat die betrekking hebben op stimulatieproeven met ACTH.

2. Stimulatie met endogeen ACTH, via blokkering van de F-synthese door SU-4885.

Overzichtstabel; tabel XII; diagram 10 en 11.

In 1958 werd door Chart en medewerkers vastgesteld dat 2-methyl-1, 2-bis-(3-pyridyl)-1-propanon (SU-4885) in staat was om bij honden de secretie van bijnierschors-hormonen te remmen.

SU-4885 is chemisch verwant met amphenon B dat de synthese van alle biologisch actieve steroiden onderdrukt en te toxisch is voor klinisch gebruik (Thorn c. s., 1956).

SU-4885 remt alleen de synthese van 11-hydroxy-steroiden en is veel minder toxisch.

Door Liddle c. s. (1958) werd SU-4885 peroraal en intraveneus toegediend aan normale proefpersonen en patienten, waarbij aanzienlijke veranderingen werden waargenomen in het bijnier-steroid-patroon in plasma en urine:

- in bijniervenbloed trad een aanzienlijke daling op van de F-concentratie.
- in plasma werden S en DOC in relatief grote hoeveelheden aangetoond.
- in plasma en urine werd een stijging waargenomen van de 17-hydroxy-steroiden.
- in urine steeg bovendien de 17-oxo-steroiden- en H_4S -concentratie.

De veranderingen traden niet op bij een patiente die een totale adrenalectomie had ondergaan en ook niet wanneer gelijktijdig met het SU-4885 exogeen F of $\Delta^1-9\alpha$ -fluoro-F werd gegeven. Bij in vitro-studies bleek 11β -hydroxylase door SU-4885 te worden geïnactiveerd.

Deze waarnemingen kunnen alle als volgt worden verklaard (fig. 7): SU-4885 remt selectief de 11-hydroxylering in de bijnierschors; van de biologisch actieve steroiden kunnen dus alleen S en DOC nog ongeremd worden gesynthetiseerd.

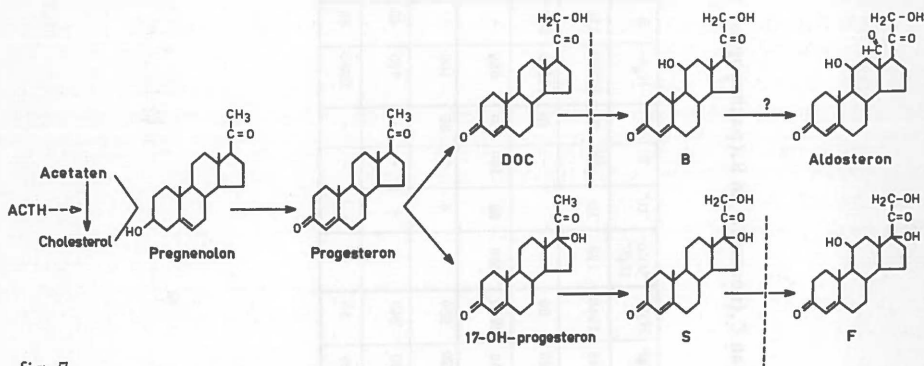


fig. 7.

De daling in de F-secretie induceert een toename van de ACTH-secretie die niet wordt onderdrukt door het zwak actieve S. De endogene ACTH-stimulatie van de bijniereen duurt dus voort totdat het plasma-F weer normale waarden heeft bereikt.

Een dergelijke gang van zaken werd door Eberlein en Bongiovanni (1956) gepostuleerd ter verklaring van een geval van adrenogenitaal syndroom met hypertensie. Wat de biochemische

TABEL XII-Reactie op SU-4885 van E.(normaal) en R.(panhypopit.) - TABLE XII-Response to SU-4885 of E.(normal) and R.(panhypopit.)

N ^o case	Naam Name	3 x 2 g dd 3 x 2 Gm. a day	H ₄ F	H ₄ E	"allo- H ₄ " r"	"I"	E	F	H ₄ S	S	H ₄ B	"allo- H ₄ " B"	H ₄ A	A	B	H ₄ DOC	DOC	H ₄ F H ₄ E	F/F	Totaal F	Totaal B	F/B	% gediff.s
40	E.	1e dag SU 4885 1stday SU 4885	640	1240	120	10	±20	30	10000	120	160	120	160	0	30	480	280	0,5	1,5	2060	470	4,4	83
40 ^a	"	2e dag SU 4885 2nddaySU 4885	80	60	-	-	-	sp	14600	240	-	-	40	0	sp	2500	400	1,3	-	140	40	3,5	99
40 ^b	"	2 dagen later 2 days later	1040	2240	400	20	100	80	580	-	140	200	160	40	60	10?	-	0,5	0,8	3880	600	6,4	13
23	R.	Basaal Basal	320	280	-	5	25	30	100	-	20	5	10	0	sp	-	-	1,1	1,2	660	35	18,7	13,2
23 ^c	"	1e dag SU 4885 1stday SU 4885	160	240	-	-	-	-	720	40	±10	20	30	0	0	-	-	0,7	-	400	60	6,7	66
23 ^d	"	2e dag SU 4885 2nd day SU 4885	30	50	-	-	-	-	2080	80	-	-	-	0	0	-	-	0,6	-	80	-	-	96

afwijkingen betreft, kan men dit ziektebeeld door toediening van SU-4885 imiteren. De hypertensie, die blijkbaar op den duur optreedt, kan worden toegeschreven aan de activiteit van het in overmaat geproduceerde DOC. In hoeverre ook S hierbij een rol speelt, is niet duidelijk.

De waarnemingen van Liddle c. s. werden bevestigd door Jenkins c. s. (1959), Coppage c. s. (1959), Gold c. s. (1960) en het eigen onderzoek.

De invloed van SU-4885 op het steroidexcretie-patroon werd nagegaan bij twee patienten:

23. Patient R. met panhypopituitarisme.

Het spectrum van deze patient onder basale omstandigheden en na ACTH-stimulatie werd reeds besproken.

40. Patiente E., 45 jaar.

Observatie neurotische anorexie.

Beide patienten kregen gedurende 2 dagen 6 g SU-4885 per dag, in drie orale doses verdeeld. Op de tweede dag ging een gedeelte van een der doses van patiente E. door braken verloren. Deze gastro-intestinale stoornis was de enige onaangename reactie op het innemen van de tabletten, die bij de patienten werd waargenomen. De resultaten van het onderzoek zijn geheel overeenkomstig de verwachtingen en verklaarbaar met bovenbeschreven theorie:

- a. in beide gevallen treedt een daling in de excretie van de gehele F- en B-groep op, vooral op de tweede dag. De veranderingen in de F/B-ratio vertonen dezelfde tendens als wordt gezien na exogene ACTH-stimulatie.
- b. bij beide patienten neemt de excretie van H_4 S aanzienlijk toe; S zelf wordt in steeds grotere hoeveelheden aantoonbaar.
- c. alleen bij patiente E. verschijnen DOC en (waarschijnlijk) H_4 DOC in toenemende hoeveelheden in de urine. DOC werd als zodanig geïdentificeerd op grond van de chemische eigenschappen (BT-positief, F1-positief) en het chromatografisch gedrag ten opzichte van authentiek DOC in drie verschillende systemen.

Aangezien authentiek H_4 DOC niet in ons bezit was, hebben wij de BT-positieve, F1-negatieve substantie, die uit fractie III/II werd geïsoleerd, niet met zekerheid kunnen identificeren.

Op grond van de volgende overwegingen hebben wij aangenomen dat de onbekende H_4 DOC is:

- 1) de substantie verschijnt, gelijktijdig met DOC, in de urine onder omstandigheden waarin men dit kan verwachten en in hoeveelheden die vergelijkbaar zijn met wat door anderen is gevonden: Coppage bijv. vond op de tweede dag 1800 μ g met zekerheid geïdentificeerd H_4 DOC.

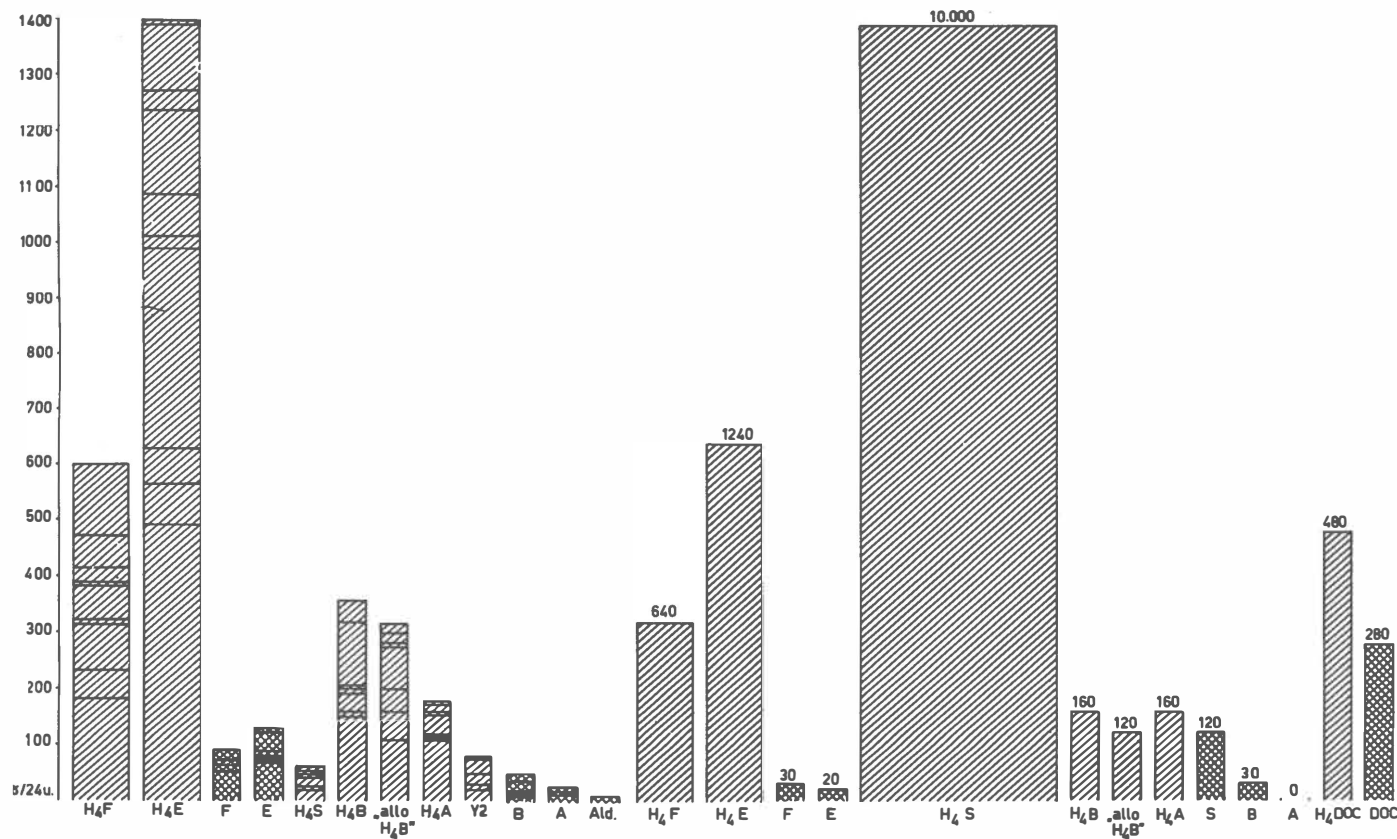


Diagram 10. Invloed van SU-4885 (3x2 g dd per oraal, 1e dag) op de steroid-excretie van pat.E. (normaal hypofyse-bijniersysteem).

Response of normal adrenals to SU-4885, 3x2 Gm a day per oral, 1st day (case 40).

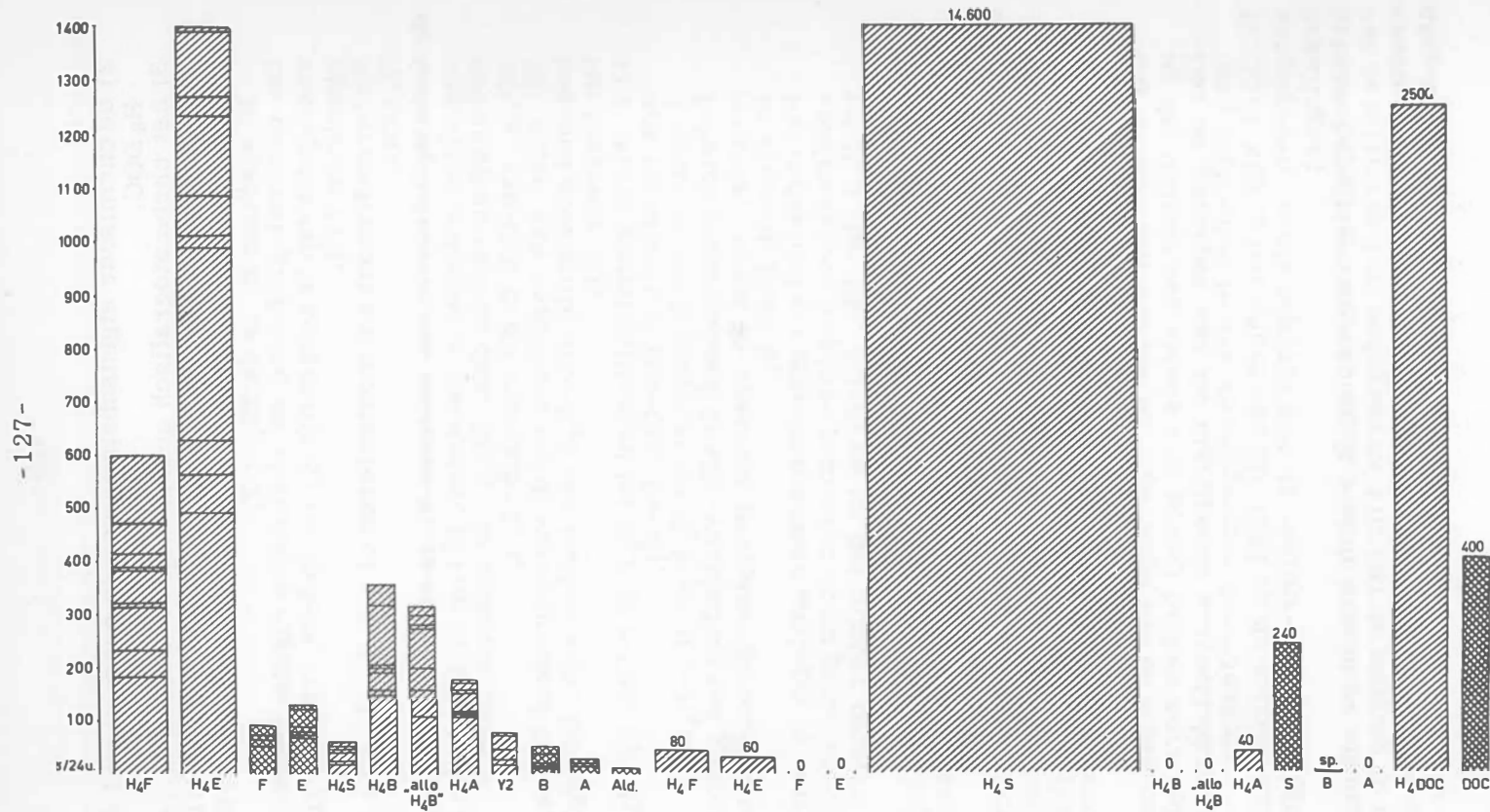


Diagram 11. Invloed van SU-4885. 2e dag.

Response to SU-4885. 2nd day.

2) de chemische eigenschappen komen overeen met die van H_4DOC .

3) het chromatografisch gedrag wijst eveneens in de richting van H_4DOC : in het systeem propyleenglycol/tolueen is de Rf_A van de onbekende 1,15 en de Rf_{DOC} 0,65-0,7; in systeem B_1 is de $Rf_A + 2$.

De chromatografische en chemische eigenschappen lijken veel op die van de substantie Z_2 uit andere urines (vgl. bijv. spectrum 13^a).

Nader onderzoek zal moeten leren of ook Z_2 identiek is met H_4DOC .

d. in de H_4B -fractie van patiënte E. is een BT-positieve, Fl-negatieve substantie aanwezig: 480 μg op de eerste dag en 960 μg op de tweede dag. Rf_{H_4B} in systeem Bush B_1 : 1,6. Rf_{H_4B} van H_4S in dit systeem: 1,3.

Bij wijze van hypothese wordt verondersteld dat deze onbekende substantie allo- H_4S zou kunnen zijn. De argumenten hiervoor zijn:

1) F wordt gemetaboliseerd tot H_4F ($3\alpha-OH$, $5\beta-H$), maar ook tot allo- H_4F ($3\alpha-OH$, $5\alpha-H$).

Evenzo wordt B omgezet tot H_4B en allo- H_4B .

In beide gevallen heeft de allo-verbinding een grotere Rf -waarde, zowel in systeem propyleenglycol/tolueen als in systeem Bush B_1 .

Het is dus niet vergezocht om naar analogie te veronderstellen dat ook S op twee manieren wordt gemetaboliseerd: tot H_4S ($3\alpha-OH$, $5\beta-H$) en tot het minder polaire allo- H_4S ($3\alpha-OH$, $5\alpha-H$).

2) het gepostuleerde allo- H_4S is nog nooit in menselijke urine aangetoond, maar de kans om het te vinden is ook zelden zo groot als in dit geval.

e. aangezien de "basale" urine van patiënte E. ons laboratorium niet heeft bereikt, werd ter verkrijging van controlewaarden een spectrum-bepaling gedaan in urine die twee dagen na stopzetting van de toediening van SU-4885 werd verzameld.

Uit de excretie van 580 μg H_4S blijkt dat de bijniereen zich op dat tijdstip nog steeds niet geheel hebben hersteld.

Dat de gevolgen van de ingrijpende enzymblokkering vrij lang aanhouden is ook waargenomen door Jenkins.

In tabel XIII is het effect van SU-4885 op de steroid-excretie aangegeven, zoals bepaald met de routine-methoden (groepsbepalingen).

In beide bepalingen weerspiegelt zich de krachtige stimulering van de bijniereen door endogeen ACTH. Dat de stijging in de excretie van de 17-hydroxy-steroiden vrijwel geheel voor rekening komt van H_4S , kan men er echter niet uit aflezen.

TABEL XIII

	17-OH	17-oxo	(mgr/24 uur).
E. basaal	5	7,3	
1e dag SU	18,6	18,6	
2e dag SU	?	?	(niet bepaald)
2 dagen later	12,7	6,7	
Ro. basaal	2,7	5,7	
1e dag SU	6,8	13,5	

Het blijkt dus dat zeer grote kwalitatieve veranderingen in de steroid-synthese kunnen voorkomen, zonder dat dit in de routinebepalingen tot uiting komt. Dit werd ook reeds opgemerkt bij de gevallen van adrenogenitaal syndroom.

Ter vergelijking wordt de steroid-excretie vermeld van een normale proefpersoon van Coppage c. s. en van een patient met prostaatcarcinoom (na castratie) van Jenkins c. s. (tabel XIII^a). In beide gevallen werd het SU-4885 op dezelfde wijze en in dezelfde dosering toegediend als in onze studie (6 g per dag per os gedurende twee achtereenvolgende dagen). De excretie is uitgedrukt in $\mu\text{g}/24$ uur.

TABEL XIII^a

	H ₄ F+H ₄ E	H ₄ S	H ₄ DOC	17-OH (Porter-Silber)	17-oxo
Coppage basaal	4600	0	0	9000	12.000
1e dag SU	-	-	-	-	-
2e dag SU	4000	13.000	1800	35.000	29.000
Jenkins basaal	2100	0	-	7.700	5.000
basaal	2200	0	-	6.800	5.400
1e dag SU	1600	3.400	-	11.200	3.200
2e dag SU	200	25.400	-	19.400	10.200

De suggestie van Liddle c. s. dat SU-4885 kan worden gebruikt om het hypofyse-bijniersysteem te beoordelen (hypofyse-ACTH-reserve) is als volgt uitgewerkt door Gold c. s. :

30 mgr SU-4885-ditartraat per kg lichaamsgewicht werd in 1 l fysiologisch zout in 4 uur intraveneus toegediend; de procedure werd de volgende dag herhaald met toevoeging van 25 mgr ACTH aan het SU-infuus.

De stijging van de 17-ketogene steroiden (Norymberski) in de 24 uren urine werd als criterium gebruikt.

De uitkomsten van de test kunnen als volgt worden samengevat:

- bij normalen steeg de excretie van de 17-hydroxy-steroiden tot ongeveer het 2-voudige van de basale waarde. De toevoeging van ACTH bracht hierin geen noemenswaardige verandering; hieruit kan worden afgeleid dat via een blokkering van de F-synthese door SU-4885 een maximale bijnierstimulatie kan worden bereikt.

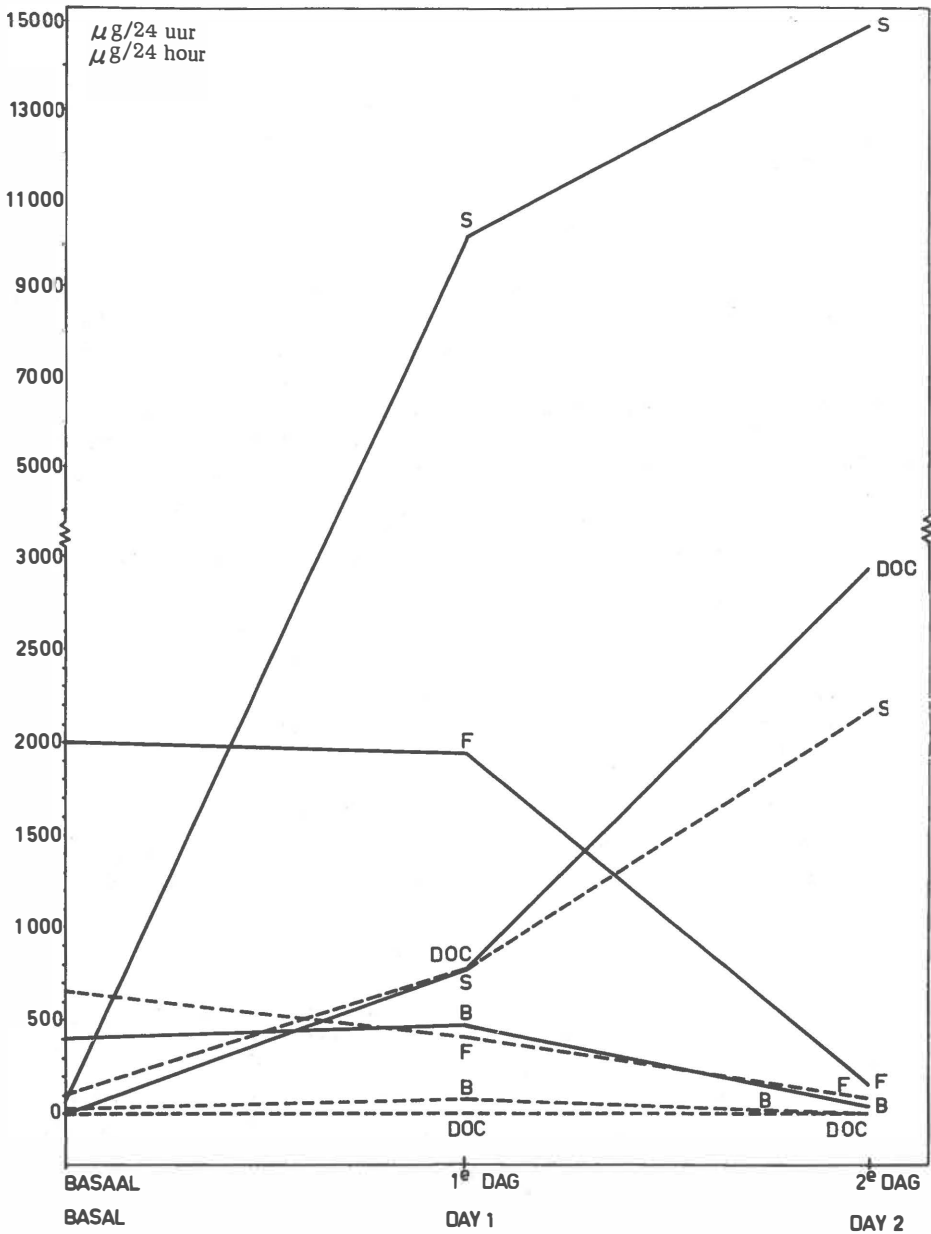


fig. 8. Verschil in reactie op SU-4885 tussen een normale controle-persoon (—) en een patient met panhypopituitarisme (---).

Difference in response to SU-4885 between a normal individual (—) and a patient with panhypopituitarism (---).

- b. een normale reactie werd o.a. ook verkregen bij twee patienten met een Cushing-syndroom tengevolge van hyperplasie en twee patienten met acromegalie.
- c. een uitblijvende of subnormale reactie werd gezien:
 - 1) bij een patient met metastaserend bijniercarcinoom.
 - 2) twee patienten met panhypopituitarisme tengevolge van een chromophoob adenoom.
 - 3) een patient met primair myxoedeem en een patient met levercirrhose, in beide gevallen toe te schrijven aan vertraagde metabolisering van F.
 - 4) bij drie patienten die werden behandeld met 4 dd 50 mgr chloorpromazine; deze waarneming wijst op een verband tussen cerebrale centra en hypophyse-activiteit.

Het verschil in reactie op de toediening van SU-4885 tussen normalen en patienten met panhypopituitarisme komt ook in de spectra van patiente E. en patient R. tot uiting en wel op een wijze die veel sterker uitgesproken en veel specifiek is, dan ooit met een groepsbepaling kan worden aangetoond.

Het komt ons voor dat wij in de bepaling van alleen H_4S al een zeer gevoelig criterium hebben voor het vaststellen van de hypophyse-ACTH-reserve met behulp van SU-4885.

Bij verder onderzoek zal zeker een grote spreiding aan het licht komen, maar de waarneming dat de H_4S -excretie bij een normale 150- resp. 200-voudig stijgt (aangenomen een gemiddelde normale H_4S -excretie van $70 \mu g/24$ uur) in tegenstelling tot een 7- resp. 20-voudige stijging bij een patient met panhypopituitarisme, biedt op het eerste gezicht grote perspectieven.

In fig. 8 is de excretie van de F-, B-, S- en DOC-groep van beide patienten nog eens uitgebeeld. Aangezien van patiente E. de basale waarden ontbreken, werd voor de F- en B-groep uitgegaan van de waarden die werden gevonden bij patiente S.-D., met wie de grootste overeenkomst bestaat wat betreft geslacht, leeftijd en omstandigheden. Het spectrum van E. dat twee dagen na stopzetting van de toediening van SU-4885 werd bepaald, mag niet als basaal worden beschouwd, omdat de steroid-excreties op dat tijdstip vrijwel zeker zijn beïnvloed door een "rebound" van de bijnierschors. Dit komt duidelijk tot uiting in de 17-hydroxy-steroiden bepaling (tabel XIII).

Ondanks de wat onzekere uitgangswaarde mag toch worden geconstateerd dat de secretie van F op de eerste dag aanzienlijk minder is gedaald dan op de tweede dag, vooral bij patiente E. Dit kan worden toegeschreven aan een acute en massale reactie van de hypophyse op de dalende F-spiegel in het plasma, waardoor de blokkering nog tijdelijk en gedeeltelijk kon worden doorbroken.

Er zijn aanwijzingen dat de synthese van B door endogeen ACTH op dezelfde "selectieve" wijze wordt gestimuleerd als door exogeen ACTH. (par. J).

J. De betekenis van de F/B-ratio.

Om na te gaan of de bepaling van de F/B-ratio van betekenis kan zijn voor de beoordeling van de bijnierschorsfunctie zullen de gegevens, die op deze ratio betrekking hebben, nog eens kort worden samengevat.

Zoals vermeld, is de ratio berekend uit de excretie van F, E, H_4F , allo- H_4F en H_4E enerzijds en van B, A, H_4B , allo- H_4B en H_4A anderzijds.

Deze berekening heeft alleen dan enige zin, indien de twee groepen steroiden een ongeveer gelijk percentage van het gesecerneerde F resp. B uitmaken, zowel in gevallen van normale als abnormale secretie en metabolisering. Ten aanzien van deze voorwaarde kan het volgende worden opgemerkt.

Volgens Peterson en Pierce (1960) zou er geen essentieel verschil bestaan tussen het metabolisme van F en B, zodat voorlopig op gezag van deze onderzoekers mag worden aangenomen dat een vrijwel gelijk percentage van de hormonen wordt omgezet in de bovengenoemde α -ketol-metabolieten, althans onder normale omstandigheden.

Er zijn aanwijzingen dat dit percentage in gevallen van abnormale secretie of metabolisering op een ander niveau kan liggen. Zo is in gevallen van levercirrhose aangetoond dat slechts weinig F in de vorm van tetrahydro-metabolieten wordt uitgescheiden: er is een verschuiving opgetreden ten gunste van bijv. E en Reichstein's U en dus waarschijnlijk ook ten gunste van metabolieten die met de gebruikte methode niet volledig geëxtraheerd of niet bepaald kunnen worden (bijv. Reichstein's E en 6β -hydroxy-F).

Hetzelfde geldt voor neonati, bij wie bijv. belangrijke hoeveelheden 6-hydroxy-F zijn aangetoond (Migeon, 1959), een metaboliet die bij normale volwassenen waarschijnlijk een te verwaarlozen deel uitmaakt van het totaal der F-metabolieten. Ook moet bij neonati nog rekening worden gehouden met het feit dat slechts $\pm 30\%$ van de F-productie in de vorm van metabolieten uit de urine kan worden geëxtraheerd, wat kan wijzen op een vorm van conjugering die bij volwassenen kwantitatief veel minder belangrijk is.

Dat er ook een verschuiving in het metabolisme kan optreden ten gunste van de door ons bepaalde groep steroiden, kan blijken uit de waarneming dat onder invloed van ACTH een groter percentage van de totale hoeveelheid 17-hydroxy-steroiden voor rekening komt van de som der individueel bepaalde 17-hydroxy-steroiden (par. C₃).

Deze voorbeelden van onderlinge verschuivingen binnen de groep van de F-metabolieten illustreren het risico dat men loopt, wanneer de productie van F wordt afgeleid uit de excretie van een incompleet aantal metabolieten (blz. 73).

De waarde van de F/B-ratio daarentegen behoeft door dergelijke verschuivingen niet noodzakelijkerwijs te worden aangetast, aangezien het zeer wel mogelijk is dat zich onder invloed van de genoemde omstandigheden gelijksoortige verschuivingen voordoen binnen de B-groep.

Op grond van deze overwegingen lijkt de conclusie gerechtvaardigd dat de F/B-ratio redelijk betrouwbare inlichtingen kan geven omtrent de activiteit van de bijnierschors.

Uit de tabellen IV t/m XII en fig. 9 blijkt het volgende:

1. De gemiddelde ratio bij normale controle-personen en enkele patienten zonder bijnierschorsafwijkingen is 6,3 met een spreiding van 3,7-10,8.

Omdat in vele gevallen geen allo-H₄F werd bepaald,, zal de normale ratio in feite iets groter zijn.

2. Een lage ratio werd gevonden bij:

a. physiologisch secundair hyperaldosteronisme:

1) levercirrhose met ascites (patient D.; ratio 3,1);

2) haemorrhagische diathese (patiente G.; ratio 2,2).

De lage F/B-ratio kan betekenen dat de activiteit van de bijniere in deze gevallen meer dan normaal op de productie van B is gericht. Wij hebben dit in verband gebracht met de verhoogde secretie van aldosteron in de vorm van de volgende hypothese.

Beide patienten hebben tengevolge van de dreigende vermindering van het bloedvolume een vermeerderde behoefte aan steroiden met mineralocorticoïde werking, wat resulteert in een verschuiving van de steroid-synthese ten gunste van de reeks progesteron → DOC → B → aldosteron.

Men kan zich nu voorstellen dat B onder deze omstandigheden in verhoogde mate uit de bijnier diffundeert, zoals S dit doet onder invloed van een verschuiving van de steroid-synthese ten gunste van de reeks progesteron → 17-hydroxy-progesteron → S → F (par.K). Zo gezien is de secretie van B slechts van ondergeschikt belang en te beschouwen als verlies van een precursor onder invloed van een stimulans tot versterkte secretie van het mineralocorticoïde hormoon aldosteron. In dat geval zou de gang van zaken een in vivo bevestiging kunnen zijn van de hypothese dat B de directe precursor van aldosteron is.

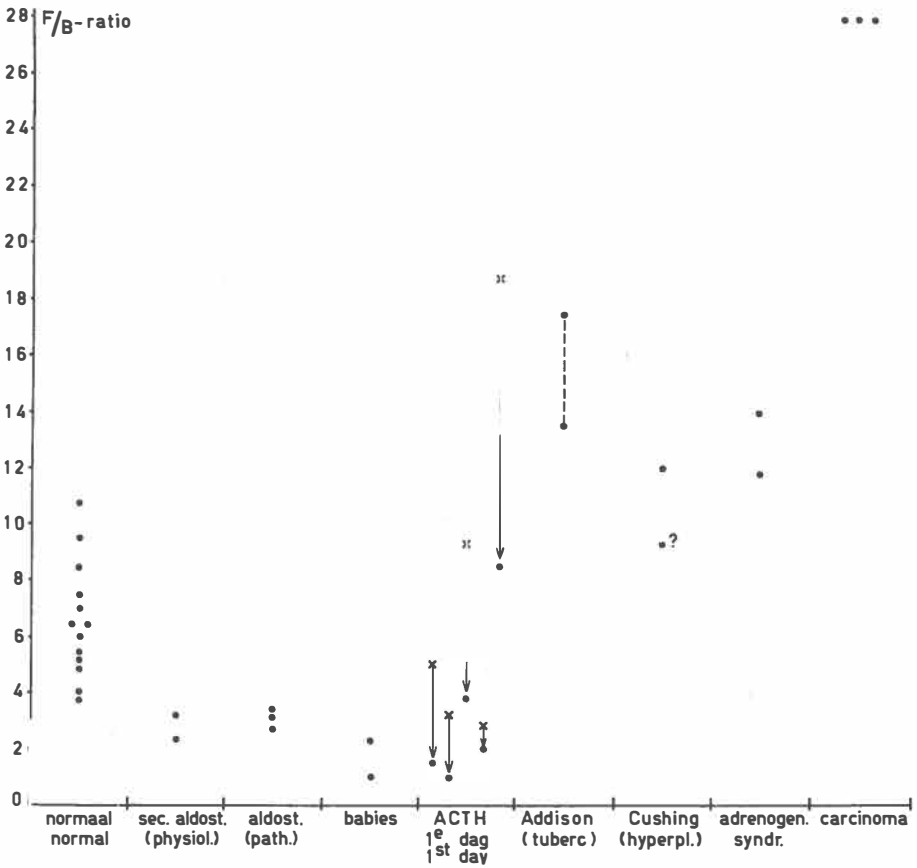


fig. 9.

Men kan zich echter ook voorstellen dat B niet slechts van betekenis is als precursor van aldosteron maar, in tegenstelling tot S, een eigen rol speelt als (mineralocorticoid) hormoon. In dat geval is de secretie van B tengevolge van de hier werkzame stimulans geen secundaire bijkomstigheid maar een van de gewenste reacties op de stimulans.

Deze opvatting wordt gesteund door het feit dat B onder alle omstandigheden in betrekkelijk grote hoeveelheden wordt gesecerneerd en een grote biologische activiteit bezit; in beide opzichten is het verschil met een precursor zonder meer, zoals S, wel heel groot.

- b. primair hyperaldosteronisme en pathologisch secundair hyperaldosteronisme (pat. E.-v.d.L., ratio 3,1; pat. M.-U., ratio 2,7; pat. B.-B., ratio 3,3).

Ook in deze gevallen lijkt de daling van de ratio in verband gebracht te kunnen worden met een verschuiving van de steroid-synthese ten gunste van de reeks mineralocorticoïde steroiden. Nader onderzoek zal moeten leren of aan de lage F/B-ratio diagnostische waarde mag worden toegekend.

- c. neonati (baby S., ratio 2,3; baby N., ratio 1,0).

Evenals in gevallen van levercirrhose is hier grote voorzichtigheid geboden bij de interpretatie van de steroid-excretie. Het is immers wel zeker dat tetrahydro-verbindingen bij pasgeborenen niet die kwantitatief belangrijke plaats innemen onder de metabolieten als bij volwassenen. In de veronderstelling dat dit zowel voor B als voor F geldt, hebben wij het gewaagd toch enige betekenis aan de lage F/B-ratio toe te kennen. De resultaten van ons oriënterend onderzoek schijnen de hypothese van Eagle en Wolfson te bevestigen dat B bij pasgeborenen (en misschien zelfs gedurende de hele kindertijd) meer op de voorgrond treedt dan op latere leeftijd. Deze onderzoekers hebben nl. in 1954 op grond van de uitkomsten van enkele groepsreacties het vermoeden uitgesproken dat de F/B-ratio bij praematuur geboren kinderen aanzienlijk lager is dan bij volwassenen.

Zij baseren hierop hun hypothese dat de productie van F phylogenetisch later optreedt dan de productie van B. Het moment waarop de F-productie duidelijk gaat overheersen, zou samenvallen met de zgn. "adrenarche", welke is gekenmerkt door een significante stijging in de excretie van de 17-oxo-steroiden op een leeftijd van 8-10 jaar (17-oxo-steroiden zijn nl. wel metabolieten van F maar niet van B).

Enige steun voor deze opvatting kan worden ontleend aan morphologisch onderzoek van foetale en kinderlijke bijnieren. In de foetale en postnatale periode bestaat de bijnierschors uit twee delen: een "foetale" schors die bij de geboorte 80% van de hele klier uitmaakt en na de geboorte in enkele weken verandert in fibreus weefsel en een "volwassen" schors die uit twee zones bestaat: een zona glomerulosa en een zona fasciculata. De ontwikkeling van een zona reticularis, volgens Symington (1960) de voornaamste productieplaats van glycocorticoïde hormonen, zou pas beginnen omstreeks het vierde levensjaar (Stoner c.s., 1953).

Het is opmerkelijk dat F zijn overheersende positie ook ontogenetisch pas laat en geleidelijk gaat innemen. Bush (1953) vond in bijniervenebloed de volgende F/B-ratio's: rat $< 0,05$; konijn $< 0,10$; fret 1,5; kat en hond 4; schaap 20. Bij de volwassen mens worden voor deze ratio door verschillende onderzoekers sterk wisselende waarden opgegeven, maar over het algemeen is de ratio toch wel aanzienlijk groter dan 1.

Het is denkbaar dat de eventuele veranderingen in de bijnierfunctie van kinderen gaan optreden, wanneer door rijping van de hypofyse en eventuele hogere centra meer of "ander" ACTH wordt geproduceerd. Dat stimuleren van bijniereen door heteroloog ("ander") ACTH op den duur tot activering van de 17-hydroxylase kan leiden is door Kass c.s. (1954) aangetoond bij konijnen. Deze onderzoekers vonden in bijniervenebloed van niet gestimuleerde dieren, evenals Bush, een F/B-ratio $< 0,05$. Eenmalige stimulatie met 15 E varkens-ACTH gaf geen verandering in de ratio; stimuleren met 15 E per dag gedurende een week bracht de ratio op 0,5 en gedurende tenminste twee weken op 4.

Uit deze resultaten kan men concluderen dat in de bijnier van konijnen 17-hydroxylase aanwezig moet zijn en dat de duur van de stimulatie van doorslaggevende betekenis is geweest. In hoeverre het gebruik van heteroloog ACTH de resultaten heeft beïnvloed, komt in de proeven niet tot uiting; homolog ACTH werd niet gebruikt. Dat de duur van een dergelijke stimulatie ook bij volwassen mensen invloed heeft op de F/B-ratio in urine, zal hieronder worden besproken.

- d. kortdurende stimulatie van normale en abnormale bijniereen met exogeen, heteroloog ACTH.

In alle gevallen (tabel XI) waarin het excretiepatroon werd bepaald na een maximale ACTH-stimulatie is de daling van de F/B-ratio onmiskenbaar. In deze gevallen is er geen sprake van een evidente verschuiving in het metabolisme van F ten gunste van andere dan α -ketol-metabolieten. Zelfs zijn er aanwijzingen dat, zo er alleen verschuiving optreedt, dit juist ten gunste van H_4F en H_4E gaat (par. C₃). Het is dus zeer waarschijnlijk dat een exogene, maximale, acute ACTH-stimulatie een groter effect heeft op de B-secretie dan op de F-secretie, wat een aanwijzing kan zijn dat de fysiologische betekenis van B groter is dan gewoonlijk wordt aangenomen (par. L).

Men kan zich in dit verband afvragen wat het effect zal zijn van een:

1) endogene ACTH-stimulatie.

De experimenten met SU-4885 schijnen erop te wijzen dat hiervan eenzelfde effect mag worden verwacht.

2) submaximale ACTH-stimulatie.

De invloed op het spectrum van ACTH in hoeveelheden < 25 mgr werd nog niet nagegaan.

3) chronische ACTH-stimulatie.

Uit de gevallen, waarbij de stimulatie op twee achtereenvolgende dagen plaats vond, blijkt dat de ratio op de tweede dag niet of nauwelijks verder is gedaald en in het normale geval zelfs al weer is gestegen. Deze tendens is een aanwijzing dat voortzetting van de ACTH-toediening weer tot een normale en zelfs een hoge F/B-ratio zal leiden. Dohan c. s. (1955) hebben dit in feite aangetoond; zij vonden dat onder invloed van ACTH een relatief grote hoeveelheid B-metaboliëten werd uitgescheiden gedurende de eerste twee dagen, terwijl pas op de derde dag een excretie-patroon werd verkregen als bij M. Cushing (hoge F/B-ratio).

Onze voorlopige conclusie is dat de steroid-synthese in de bijnier ten gunste van B verschuift onder invloed van een acute ACTH-stimulatie en ten gunste van F onder invloed van een chronische ACTH-stimulatie. De waarnemingen, vermeld onder punt 3, schijnen deze conclusie te steunen.

3. Een hoge F/B-ratio werd gevonden bij:

- a. syndroom van Cushing tengevolge van hyperplasie (pat. O., ratio 12; pat. v. d. H. ?, ratio 9, 3).
- b. adrenogenitaal syndroom (pat. M. -F., ratio 12; pat. Sche., ratio 14).
- c. primaire bijnierinsufficiëntie tengevolge van tuberculose (pat. L., ratio 13, 5-17, 4), eindstadia uitgezonderd (pat. Ba., ratio 3, 8).

Wij veronderstellen dat de hoge ratio in alle gevallen in verband kan worden gebracht met een continue, versterkte stimulering van de bijnieren door endogeen ACTH.

Voor de zeer hoge ratio in een geval van panhypopituitarisme (pat. R., ratio 18, 9) hebben wij geen verklaring; wel kan worden opgemerkt dat de verhoudingen in het hypothalamus-hypofyse-bijniersysteem hier in verband met de ongewone aetiologie anders kunnen liggen dan in gevallen van panhypopituitarisme met primaire beschadiging van de adeno-hypofyse.

4. Een uitzonderlijk hoge F/B-ratio werd gevonden bij bijniercarcinoom (pat. J. A. en pat. M.; ratio in beide gevallen ± 30 ; pat. v. T., ratio ± 46).

Uit de literatuur werden de volgende gegevens betreffende de F/B-ratio bij personen met normale bijniere verzameld:

1. in urine:

Romani (1959): 5-13, 5.

Peterson en Pierce (1960): 12, 4 en 5 (na ACTH 4, 4).

2. in perifeer bloed:

Bush en Sandberg (1953): > 5 ; geen invloed van ACTH.

Sweat c. s. (1955): gem. 2, 5.

Morris en Williams (1955): gem. 1, 0; geen invloed van ACTH.

Weichselbaum c. s. (1955): gem. 1, 0.

Starlinger en Tamm (1955): gem. 6.

Takeda (1956): 1, 5-4.

Peterson (1957): gem. 10; na ACTH 5.

Bondy c. s. (1957): gem. 7, 9.

Ely c. s. (1958): gem. 3, 5; geen invloed van ACTH.

Deze waarden zijn berekend uit de hoeveelheden F resp. B die als zodanig in plasma zijn bepaald met behulp van zeer uiteenlopende technieken.

Het is duidelijk dat er groot verschil van mening bestaat omtrent de werkelijke F/B-ratio in bloed. Het feit dat er altijd sprake is van een momentopname speelt hierbij een grote rol. De zeer lage waarden berusten volgens Neher (1958) op meetfouten en zijn dus het minst waarschijnlijk. Ook over het effect van ACTH op de plasma F/B-ratio bestaat geen overeenstemming.

3. in bijniervenebloed:

Romanoff c. s. (1953): gem. 10 (na ACTH).

Sweat c. s. (1953 en 1955): 2-10.

Hudson en Lombardo (1955): gem. 11; na ACTH 3-4.

Pincus c. s. (1955): 0, 5-3, 5 (na ACTH).

Grant c. s. (1957): $\leq 2, 3$; na ACTH ≥ 3 .

Lombardo c. s. (1959): 2, 5-17.

Deze waarnemingen betreffen patienten met metastaserend mamma- en prostaatcarcinoom die werden onderworpen aan adrenalectomie. De ratio weerspiegelt dus de activiteit van bijniere onder acute ACTH-stimulering.

In dit verband is de waarneming van Grant, Forrest en Symington (1957 en 1960) interessant. Bij vijf patienten werd bilaterale adrenalectomie verricht met een interval van ten minste zeven dagen.

De eerste bijnier werd verwijderd zonder een voorbehandeling met ACTH. De F/B-ratio bedroeg resp. 1, 3-2, 3-1, 9-2, 2-1, 9; het microscopisch aspect van de bijnier was normaal (lipoidrijke zona fasciculata).

De tweede bijnier werd verwijderd nadat gedurende drie prae-operatieve dagen 100 E ACTH-gel per dag was toegediend. De F/B-ratio bedroeg resp. 5, 9-3, 0-3, 8-3, 8-9, 8;

bij microscopisch onderzoek bleek de zona reticularis aanzienlijk verbreed door lipoid-depletie van de binnenste fasciculata-lagen. Een acute stimulatie met ACTH (operatiestress) resulteert blijkbaar in een lage F/B-ratio; het aspect van de bijnier verandert daarbij niet. Een langer aanhoudende stimulatie met ACTH induceert een hogere F/B-ratio, die gepaard gaat met een transformatie van de schors. Uit deze gegevens blijkt dat er in de literatuur over de F/B-ratio, geen algemeen erkende feiten zijn te vinden die in strijd zijn met onze waarnemingen en hypothesen.

K.. De betekenis van H_4S voor de diagnostiek van bijnierschors- en hypophyse-afwijkingen.

Gedurende het onderzoek werden wij getroffen door de opvallende frequentie waarmee H_4S zich onderscheidt van de overige corticosteroiden uit het spectrum.

Aangezien het zeer wel mogelijk is dat deze onverwachte waarnemingen van betekenis kunnen worden voor de beoordeling van de bijnierschorsfunctie, zullen de verzamelde gegevens aan een nadere beschouwing worden onderworpen.

H_4S is waarschijnlijk de belangrijkste metaboliet van S. Door het ontbreken van een hydroxylgroep aan C^{11} wordt S niet, zoals F en B, in een nauwverwant biologisch actief steroid omgezet. Aangezien ook nooit met zekerheid een isomeer, analoog aan allo- H_4F of allo- H_4B , in urine is aangetoond, nemen wij aan dat $H_4S + S$ eenzelfde percentage van het geproduceerde S vertegenwoordigt als $H_4F + H_4E + \text{allo } H_4F + E + F$ van het geproduceerde F en als $H_4B + \text{allo } H_4B + H_4A + A + B$ van het geproduceerde B.

Het staat wel vast dat S mag worden beschouwd als de belangrijkste directe precursor van F (fig. 7). Ook is bekend dat deze precursor als zodanig door de bijnier kan worden afgegeven aan het bloed: het steroid zelf is aangetoond in bijniervenebloed en zijn tetrahydro-metaboliet in urine. Door ons werden kleine hoeveelheden H_4S , variërend van 20 - 120 $\mu g/24$ uur, in alle onderzochte urines aangetoond.

Op grond van een berekening, die van dezelfde premisses uitgaat als genoemd bij de bespreking van de F/B-ratio, is bij benadering vastgesteld dat onder normale omstandigheden 1-3% van de precursor S uit de bijnierschors diffundeert voordat de 11-hydroxylering heeft plaats gevonden (1-3% van het totaal van de F- en S-groep komt nl. voor rekening van de S-groep). Een aanzienlijke stijging van dit percentage, afgeleid uit een relatieve of absolute stijging van de H_4S -excretie, is waargenomen in vier zeer uiteenlopende omstandigheden:

1. bijnierinsufficiëntie.
2. stimulering van de bijniere met ACTH.
3. bijniercarcinoom.
4. blokkering van de F-synthese door SU-4885.

1. Bijnierinsufficiëntie.

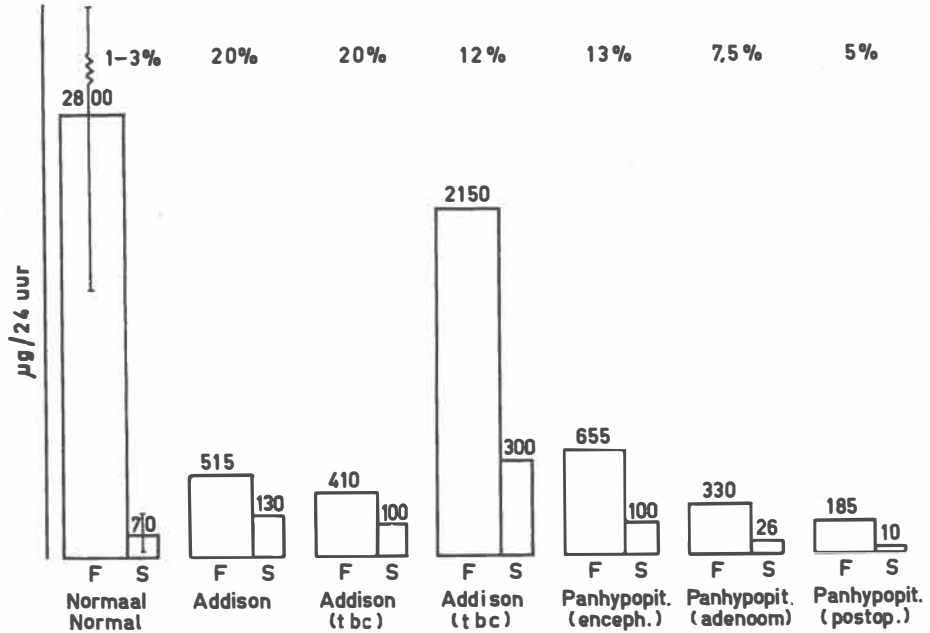


fig. 10. F/S-relatie bij patiënten met bijnierinsufficiëntie.

F/S-ratio in patients with adrenal insufficiency.

Uit fig. 10 en de spectra van tabel VII blijkt duidelijk dat in vier gevallen van bijnierinsufficiëntie—de drie Addison-patiënten en patient R. met panhypopituitarisme—een opvallend hoge excretie van H_4S werd vastgesteld. Hieruit werd berekend dat resp. 20, 20, 12 en 13% van de presursor als zodanig aan het bloed is afgegeven. Deze percentages liggen zo ver boven normaal, dat het geoorloofd lijkt hieruit bepaalde conclusies te trekken. Wij hebben te weinig vertrouwen in de berekening om de geringere stijging van het percentage, die in de overige gevallen van deze groep werd vastgesteld, als reëel te beschouwen. In deze gevallen is nl. niet alleen de productie van steroiden abnormaal maar waarschijnlijk ook, samenhangend met de hypothyreoidie, het metabolisme. Aangezien in een ander geval van gestoord metabolisme (levercirrhose) een percentage van 5 werd berekend, durven wij voorlopig geen grote betekenis te hechten aan percentages van resp. 5, 7,5 en 3.

Het is wel duidelijk dat de drie Addison-patiënten zich als groep onderscheiden van de groep patiënten met secundaire

bijnierinsufficiëntie: zonder uitzondering is de excretie van H_4S relatief (patiente v. d. L. en patient Ba.) of absoluut (patient L.) zeer hoog.

Men kan zich afvragen waarom in deze gevallen zoveel van de precursor uit de bijnier diffundeert.

Het is mogelijk dat bij bepaalde vormen van deze ziekte de 11-hydroxylering ernstiger is getroffen dan de andere enzymatische processen. Een partiële blokkering van de 11-hydroxylering, in combinatie met een sterk verminderde productie van precursors, zou het abnormale secretie-patroon inderdaad te voorschijn kunnen roepen.

Deze gang van zaken lijkt echter niet waarschijnlijk wanneer het pathologisch gebeuren in de bijnieren haardvormig optreedt, zoals bij bijnier tuberculose. In deze gevallen (patienten Ba. en L.) moet toch worden aangenomen dat bepaalde gedeelten van de bijnierschors niet in het ziekteproces zijn betrokken en dus in principe normaal kunnen functioneren; naarmate meer cellen worden verwoest, zal de productie wel kwantitatief maar niet noodzakelijkerwijs kwalitatief moeten veranderen. Dat er toch een verschuiving in de secretie ten gunste van S optreedt, kan misschien in verband worden gebracht met het algemeen erkende feit dat de intacte klier gedeelten onder continue ACTH-stimulering staan en zich dus in een toestand van chronische hyperactiviteit bevinden. Dit zou, door overbelasting van het 11-hydroxyleringssysteem, tot een "stuwing" van S kunnen leiden waardoor een relatief grote hoeveelheid van de precursor uit de cellen diffundeert. Deze hypothese wordt gesteund door de resultaten van bijnierstimulatie-proeven die onder punt 2 worden besproken.

De bijnierinsufficiëntie van de vierde patient met een hoge S-secretie (Pat. R., percentage 13) is zonder enige twijfel van secundaire aard. Toch toont het spectrum, speciaal wat de H_4S -excretie en de F/B-ratio betreft, een veel grotere overeenkomst met het spectrum van de Addison-patient L., dan met de spectra van de andere patienten met panhypopituitarisme. Pat. R. onderscheidt zich nog op andere wijze van deze patienten nl. door de anamnestiche aanwijzingen dat de primaire zetel van het ziekteproces in dit geval niet de adrenohypophyse zelf is, maar een hoger gelegen centrum. Het is mogelijk dat er verband tussen deze twee bijzonderheden bestaat, maar deze gedachte is volkomen speculatief.

Een praktische consequentie van deze waarnemingen is dat een onevenredig hoge excretie van H_4S , in combinatie met een geringe excretie van de overige corticosteroiden, moet

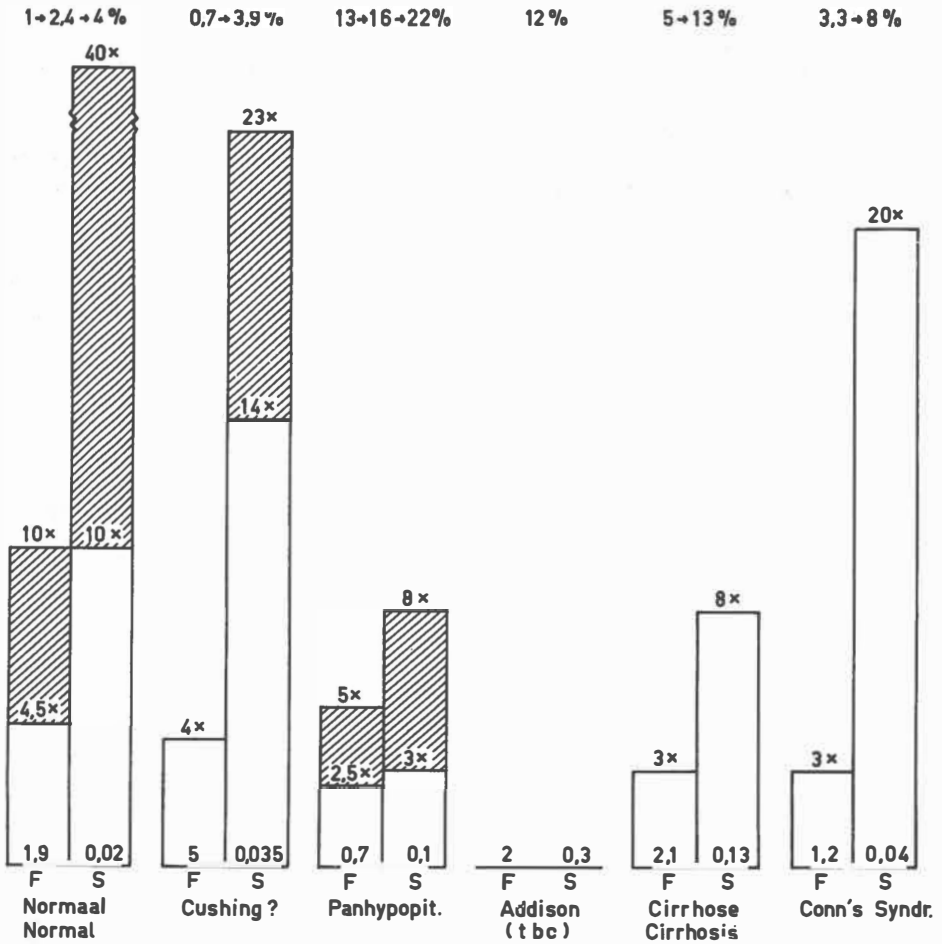


fig. 11. Excretie-toename van de F- en S- groep onder invloed van ACTH op de 1e dag (open kolommen) en de 2e dag (gearceerde kolommen). De basale waarden zijn aangegeven in mgr/24 uur. Boven de kolommen is de toename van het percentage gediffundeerd S aangegeven.

Increase in F- and S-excretion under ACTH-stimulation on the 1st day (open bars) and the 2nd day (hatched bars). Basal values given in mgr/24 hours.

doen denken aan bijnierinsufficiëntie, zeer waarschijnlijk van primaire aard. In latente gevallen, waarbij de excretie van de F- en B-groep nog binnen normale grenzen ligt, kan de bepaling van H_4S misschien van diagnostische waarde zijn.

2. Stimulering van de bijniere met ACTH.

Met uitzondering van de Addison-patient reageren alle proefpersonen op de toediening van ACTH met een aanzienlijke toename van de H_4S -excretie (tabel XI, fig. 11).

De stijging in de excretie wordt door geen enkele F-metaboliët overtroffen. Op de tweede stimulatiedag is de stijging verder toegenomen. Uit de percentage-berekening blijkt dat de hoeveelheid S, die op de eerste stimulatiedag uit de bijnier diffundeert, tenminste 2 x zo groot is als onder basale condities. Een uitzondering is pat. R. bij wie de secretie van alle corticosteroiden in een langzamer tempo toeneemt. Bij de normale proefpersoon is de diffusie van S op de tweede dag zelfs 4-voudig toegenomen.

Het is naar analogie van dit effect van exogeen ACTH dat wij de versterkte diffusie van S bij de Addison-patienten hebben toegeschreven aan een effect van endogeen ACTH. De term "diffusie" is naar onze mening beter dan "secretie", aangezien de afgifte van S aan het bloed waarschijnlijk een passief gebeuren is, secundair aan de stimulering van de F-secretie: het grote aanbod van de precursor overtreft de capaciteit van het 11-hydroxyleringssysteem, zodat een steeds groter gedeelte ervan uit de cellen diffundeert.

3. Bijniercarcinoom.

Tabel VIII en IX, fig. 12.

Bij twee van de drie patienten met een syndroom van Cushing werd een zeer hoge H_4S -excretie vastgesteld: pat. J. - A., prae-operatieve H_4S -excretie $1200 \mu g$ - percentage 7,5; post-operatieve H_4S -excretie $1600 \mu g$ - percentage 8,8 en patiente M., H_4S -excretie $2560 \mu g$ - percentage 16.

Bij beide patienten bleek een carcinoom de oorzaak van het syndroom te zijn.

Bij een van de drie patienten met een adrenogenitaal syndroom werd een zeer hoge H_4S -excretie vastgesteld: pat. v. T., H_4S -excretie $1280 \mu g$ - percentage 22. Ook bij deze patiente bleek een carcinoom de oorzaak van het syndroom te zijn.

Naar aanleiding van deze waarnemingen werd in de literatuur gezocht naar mededelingen over patienten met een sterk verhoogde excretie van H_4S . Het resultaat was als volgt: Rosselet c. s. (1954):

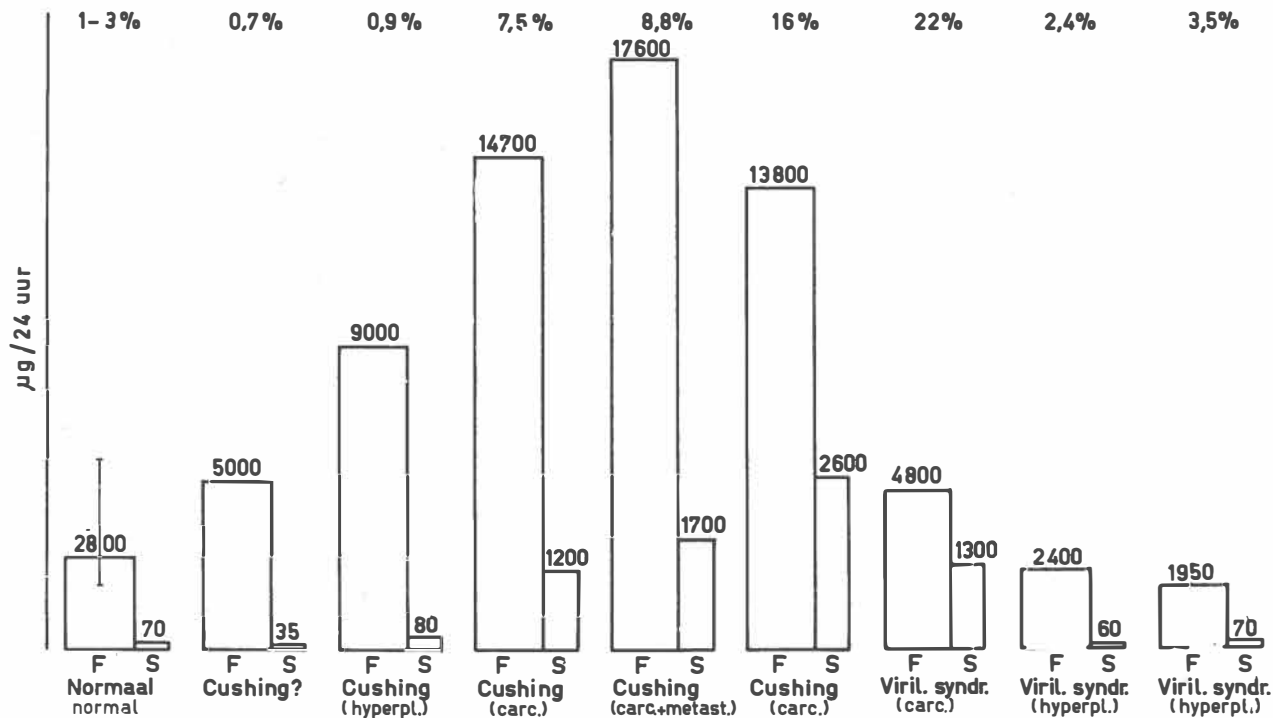


fig. 12. F/S-relatie bij patiënten met hyperfunctie van de bijnierschors.

F/S-ratio in patients with Cushing's syndrome or adrenogenital syndrome.

twee patienten met een H_4S -excretie van resp. 3400 en 11.200 $\mu g/24$ uur; diagnose in beide gevallen: bijniercarcinoom.

Touchstone c. s. (1954):

een patient met een H_4S -excretie van 12.400 $\mu g/24$ uur; diagnose: viriliserend bijniercarcinoom met metastasen.

Touchstone c. s. (1957):

twee patienten met een H_4S -excretie van resp. 250 en 1700 $\mu g/24$ uur; diagnose: syndroom van Cushing tengevolge van bijnierhyperplasie (symptomatologie niet beschreven);

een patient met een H_4S -excretie van 15.000 $\mu g/24$ uur; diagnose: syndroom van Cushing tengevolge van bijniercarcinoom met metastasen;

een patient met een H_4S -excretie van 2500 $\mu g/24$ uur; diagnose: feminiserend carcinoom met metastasen.

Höckfelt c. s. (1959^b):

een patient met een H_4S -excretie van 2500 $\mu g/24$ uur; diagnose: syndroom van Cushing met electrolytveranderingen als bij primair hyperaldosteronisme; bij obductie werden hyperplastische bijnieren gevonden en een metastaserend schildkliercarcinoom.

Ungar en Dorfman (1956) gaven een patient met metastaserend bijniercarcinoom acetaat- $1-C^{14}$; bij onderzoek van de urine-steroiden bleek het radioactief gemerkte acetaat voor een groot deel te zijn ingebouwd in metabolieten van S.

In totaal zijn dus bij elf patienten met symptomen van bijnierhyperfunctie (drie eigen gevallen en acht gevallen uit de literatuur) zeer sterke aanwijzingen gevonden voor een overmatige secretie van S (H_4S -excretie > 1 mgr/24 uur); in negen van deze gevallen bleek de oorzaak van het syndroom een bijniercarcinoom te zijn. Hier staat tegenover dat ons, behalve de genoemde uitzonderingen (Touchstone c. s., 1957 en Höckfelt c. s., 1959) geen gevallen van Cushing tengevolge van een benigne bijnierafwijking bekend zijn, waarbij een sterk verhoogde H_4S -excretie werd waargenomen en dat slechts één patient met bijniercarcinoom is beschreven, waarbij een normale H_4S -excretie werd vastgesteld. In dit geval (Romani, 1959) werd 96 μg H_4S geïsoleerd; in dezelfde publicatie wordt bij de beschrijving van drie Cushing-patienten met een benigne aetiologie, over de H_4S -excretie niets meegedeeld, zodat mag worden geconcludeerd dat de carcinoompatient zich ook in deze serie heeft onderscheiden door een relatief hoge H_4S -excretie.

Ter verklaring van het overmatig precursorverlies in gevallen van bijniercarcinoom kan worden gedacht aan defecten in het 11-hydroxyleringsstelsel, aan versnelde synthese

waardoor dit systeem wordt overbelast en aan veranderingen in de celpermeabiliteit.

Uit de literatuurgegevens en de resultaten van het eigen onderzoek kan worden geconcludeerd dat de bepaling van H_4S in de urine een belangrijke bijdrage kan leveren tot de praee-operatieve diagnose en de post-operatieve prognose van bij-niercarcinomen.

Een onevenredig hoge excretie van H_4S in combinatie met een hoge totale steroid-excretie moet o.i. doen denken aan de mogelijkheid van carcinoom als oorzaak van een syndroom van Cushing of een virilisatie- of feminisatie-syndroom.

4. Blokkering van de F-synthese door SU-4885.

Een zeer hoge excretie van de S-groep werd waargenomen na toediening van SU-4885 aan een persoon met een normaal hypophyse-bijniersysteem.

Dit is uitvoerig besproken in par. I₂.

L. De physiologische betekenis van corticosteron.

Over de betekenis van corticosteron voor het menselijk organisme is vrijwel niets bekend. Dit zal zeker samenhangen met het feit dat corticosteron en zijn metabolieten, door het ontbreken van een 17-hydroxy-groep, niet kunnen worden bepaald met de gebruikelijke routinebepalingen van corticosteroiden in bloed en urine.

Aangezien cortisol en aldosteron geheel aan de behoefte aan glycocorticoïde resp. mineralocorticoïde substanties schijnen te kunnen voldoen, lijkt de productie van een in beide opzichten minder gespecialiseerd hormoon als corticosteron op het eerste gezicht volkomen overbodig.

Men zou zich daarom de positie van corticosteron kunnen voorstellen als:

1. een precursor van aldosteron (par. J.).
2. een "rudimentair" hormoon dat vroeger in de ontogenese (en misschien in de phylogenese) betekenis heeft gehad als glycocorticoïde substantie (rat, konijn), maar bij de mens is verdrongen door het in dit opzicht veel sterker gespecialiseerde cortisol.

Wanneer corticosteron onder alle omstandigheden in te verwaarlozen hoeveelheden zou worden gesecerneerd, zou een van deze mogelijkheden een bevredigende verklaring kunnen zijn voor de aanwezigheid van dit hormoon.

De secretie van corticosteron is echter niet kwantitatief onbelangrijk. Onder basale omstandigheden bedraagt de corticosteronsecretie weliswaar slechts $\pm 1/5$ van de cortisolsecretie, maar onder invloed van een operatie-"stress" bijv. kan het gehalte aan corticosteron in het bijniervenebloed vrij-

wel gelijk worden aan het gehalte aan cortisol (Grant c. s. 1960). Ook wij hebben onder bepaalde omstandigheden een zo grote secretie van corticosteron kunnen vaststellen, dat wij de genoemde verklaringen niet zonder meer kunnen accepteren.

In een poging om corticosteron een plaats te geven tussen de andere hormonen, hebben wij gedacht aan de mogelijkheid dat corticosteron een speciale rol zou kunnen spelen in het complex van reacties dat reflectoir in gang wordt gezet, wanneer het milieu interieur van het organisme wordt bedreigd.

Veranderingen in chemische samenstelling, druk of volume van de lichaamsvloeistoffen werken als stimuli die een reeks neuro-viscerale (respiratoire, circulatoire) en neuro-endocriene reflexen teweegbrengen.

De neuro-endocriene reflexen omvatten:

1. het bijniemerg (Cannon)
→adrenaline en nor-adrenaline.
2. het hypothalamus-neurohypofyse-systeem
→antidiuretisch hormoon.
3. het hypothalamus-adenohypofyse-bijnierschors (zona reticularis)-systeem (Selye)
→CRF → ACTH → cortisol (en corticosteron).
4. het "epifyse"-bijnierschors (zona glomerulosa)-systeem
→"glomerulotrophine" → aldosteron (Farrel, 1960).

De oorzaken van verstoringen in het milieu interieur behoeven niet noodzakelijkerwijs het karakter van een "beschadiging" te hebben; ook invloeden van het normale dagelijkse leven (emoties, geluid, verandering van lichaamshouding) zijn vaak voldoende om de genoemde reflexen op te wekken.

De reflexen verlopen, onafhankelijk van de aard van de uitlokkende stimuli, volgens eenzelfde patroon en zullen dan ook in eerste instantie niet altijd resulteren in een doelmatige correctie; vaak zullen in tweede instantie meer selectieve mechanismen in actie moeten komen om de specifieke veranderingen in het milieu interieur te corrigeren (Sayers en Royce, 1960).

In aanmerking genomen dat de bijnierschors geen voorraden van de geproduceerde hormonen kan vormen en hoogstens een kleine hoeveelheid precursors (cholesterol) in de zona fasciculata kan stapelen, lijkt corticosteron bij uitstek geschikt om een rol in de eerste fase van een reflexmechanisme te spelen:

1. de synthese van corticosteron kan snel geschieden. Van de drie bijnierschorshormonen heeft corticosteron nl. de minst gecompliceerde bouw; de synthese vereist vanaf progesteron slechts een 21- en 11-hydroxylering. Voor de productie van F en aldosteron is bovendien nog een 17-hydroxylering, resp. 18-oxidiering nodig.
2. terwijl de productie van aldosteron waarschijnlijk is beperkt tot de zona glomerulosa en de synthese van F tot de zona fasciculata (compacte cellen), kan B in alle zones worden gesynthetiseerd (Ayres, 1960; Symington, 1960).

3. corticosteron heeft zowel een aanmerkelijke glycocorticoïde als mineralocorticoïde werking; met één hormoon is de behoefte naar beide richtingen voorlopig gedekt. Wanneer de situatie op den duur de inzet van uitgesproken mineralocorticoïde resp. glycocorticoïde substanties eist, zal de synthese ten gunste van het hoger gespecialiseerde aldosteron resp. cortisol verschuiven.

Naast deze theoretische beschouwingen kunnen enkele feiten worden gesteld, die erop wijzen dat de corticosteronsecretie minder selectief wordt gereguleerd dan de secretie van cortisol en aldosteron.

Uit ons onderzoek is nl. gebleken dat de secretie van corticosteron onder invloed van zeer uiteenlopende stimuli kan toenemen:

1. onder invloed van een stimulans tot productie van mineralocorticoïde substanties (bloedverlies, gedecompenseerde levercirrhose). Deze stimulans heeft geen invloed op de cortisolsecretie.
2. onder invloed van een stimulans tot productie van glycocorticoïde substanties (kortdurende stimulering van de bijnierschors met exogeen heteroloog ACTH). Deze stimulans heeft nauwelijks invloed op de aldosteronsecretie.

Het is zeer onwaarschijnlijk dat het bijnierschors-stimulerende hypofyse-secreet van de mens onder alle omstandigheden dezelfde samenstelling heeft als het door ons gebruikte commerciële ACTH-praeparaat (West, 1960).

Naar analogie van het verschil in activiteit van de ACTH-fracties δ_1 en β van Bell ten aanzien van de aldosteronproductie zou men kunnen veronderstellen, dat zich in het hypofyse-secreet een fractie bevindt die voornamelijk de corticosteronproductie stimuleert. In dat geval zou de F/B-ratio in het bijniersecreet dus kunnen worden bepaald zowel door de samenstelling van het "ACTH" als door de duur van de stimulatie.

Onze fantasieën betreffende de mogelijke betekenis van corticosteron voor het menselijk organisme kunnen als volgt worden samengevat:

dank zij een snelle synthese die niet aan hoog-georganiseerde cellen is gebonden, een weinig gespecialiseerde werkzaamheid en een universele regulatie van de secretie is corticosteron bij uitstek geschikt om kleine, plotselinge veranderingen in het milieu interieurreflectoir te corrigeren, zodat het niet altijd noodzakelijk is om hooggespecialiseerde hormonen in te schakelen.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES.

In deze dissertatie is een methode beschreven voor de bepaling van een kwantitatief corticosteroiden-spectrum in urine (Hoofdstuk III).

De spectra omvatten de volgende steroïden (Hoofdstuk IV):

1. de bijnierschors-hormonen:

11 β , 17 α , 21-trihydroxy-pregn-4-een-3, 20-dion = hydrocortison = cortisol = F;

11 β , 21-dihydroxy-pregn-4-een-3, 20-dion = corticosteron = B;

11 β , 21-dihydroxy-3, 20-dioxo-pregn-4-een-18-al = aldosteron.

2. een aantal metaboliëten van deze hormonen:

a. metaboliëten van cortisol:

3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrahydroxy-5 β -pregnaan-20-on = tetrahydro-cortisol = H₄F;

3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrahydroxy-5 α -pregnaan-20-on = allo-tetrahydro-cortisol = allo-H₄F;

3 α , 17 α , 21-trihydroxy-5 β -pregnaan-11, 20-dion = tetrahydro-cortison = H₄E;

17 α , 21-dihydroxy-pregn-4-een-3, 11, 20-trion = cortison = E;

17 α , 20, 21-trihydroxy-pregn-4-een-3, 11-dion = Reichstein's U.

b. metaboliëten van corticosteron:

3 α , 11 β , 21-trihydroxy-5 β -pregnaan-20-on = tetrahydro-corticosteron = H₄B;

3 α , 11 β , 21-trihydroxy-5 α -pregnaan-20-on = allo-tetrahydro-corticosteron = allo-H₄B;

3 α , 21-dihydroxy-5 β -pregnaan-11, 20-dion = tetrahydro-11-dehydro-corticosteron = H₄A;

21-hydroxy-pregn-4-een-3, 11, 20-trion = 11-dehydro-corticosteron = A.

3. enkele "precursors" van de hormonen:

a. 17 α , 21-dihydroxy-pregn-4-een-3, 20-dion = Reichstein's S.

Deze directe precursor van cortisol werd aangetoond:

1) bij patiënten met bijniercarcinoom (spectra 26^a, 27 en 32);

2) na stimulatie met exogeen ACTH (spectra 28^a, 13^a en 23^b);

3) na blokkering van de cortisol-synthese door SU-4885 (spectra 40, 40^a, 23^c en 23^d).

b. 21-hydroxy-pregn-4-een-3, 20-dion = desoxycorticosteron = DOC.

Deze precursor van corticosteron en aldosteron werd aangetoond:

- 1) bij een patient met gedecompenseerde levercirrhose na ACTH-stimulering (spectrum 13^a);
 - 2) na blokkering van de cortisol-synthese door SU-4885 (spectra 40 en 40^a).
4. enkele metabolieten van de precursors:
- a. 3 α , 17 α , 21-trihydroxy-5 β -pregnaan-20-on = tetrahydro-Reichstein's S = H₄S.
Deze metaboliet van Reichstein's S werd in alle onderzochte urines aangetoond.
 - b. 3 α , 21-dihydroxy-5 β -pregnaan-20-on = tetrahydro-desoxycorticosteron = H₄DOC.
Deze metaboliet van desoxycorticosteron werd (zeer waarschijnlijk) aangetoond na blokkering van de cortisol-synthese door SU-4885 (spectra 40 en 40^a) en mogelijk ook in enkele andere gevallen (bijv. substantie Z₂ in spectrum 13^a).
 - c. een groep metabolieten van 17-hydroxy-progesteron werd langs indirecte weg bepaald in gevallen van adrenogenitaal syndroom (par. IV - C₃).

Bovendien werd een groot aantal niet-geïdentificeerde substanties geïsoleerd, o. a. de zogenoemde substanties Y_a en Y₂, waarvan de excretie bij patienten met bijniercarcinoom aanzienlijk is toegenomen (spectra 26, 26^a, 27 en 32).

De betrouwbaarheid van de methodiek blijkt uit:

1. de resultaten van de duplo-bepalingen (overzichtstabel).
2. een recovery-percentages van aan urine toegevoegde authentieke steroiden van $\pm 80\%$ (tabel II).
3. een zeer goede correlatie met het klinische beeld (par. IV - D t/m par. IV - H).
4. een over het algemeen goede correlatie met de uitkomsten van de routine steroidbepalingen (par. IV - C₃).

De praktische bruikbaarheid van de methode blijkt uit het feit dat twee personen in staat waren om in een Klinisch-chemisch Laboratorium ruim 60 spectra te bepalen in een periode van $\pm 1\frac{1}{2}$ jaar (de ontwikkelingstijd van de methodiek inbegrepen).

De volgende waarnemingen zijn van praktisch-diagnostisch belang:

1. bijnierinsufficiëntie is gekenmerkt door een zeer geringe excretie van hormonen en metabolieten. Indien de excretie van cortisol en zijn metabolieten nog binnen de normale variatiebreedte valt, kan een verhoogde excretie van H₄S en een hoge F/B-ratio op insufficiëntie wijzen (par. IV - G; fig. 9 en 10).

Differentiatie tussen primaire en secundaire insufficiëntie is zeer goed mogelijk viabepaling van de hypophyse- ACTH -reserve met de SU-4885 -test, vooral als de excretie van H_4S als criterium wordt genomen (par. IV - I_2).

2. een typisch syndroom van Cushing, veroorzaakt door bijnierhyperplasie, is gekenmerkt door een hoge excretie van cortisol en zijn metabolieten en een hoge F/B-ratio (par. IV - H_1).
3. adrenogenitaal syndroom, veroorzaakt door bijnierhyperplasie, is gekenmerkt door een hoge F/B-ratio en vooral door het feit dat de cortisol-metabolieten een opvallend klein gedeelte (<10%) van de totale 17-hydroxy-steroiden uitmaken (par. IV - H_2).
4. primair en secundair hyperaldosteronisme zijn gekenmerkt door een hoge excretie van aldosteron en een lage F/B-ratio (par. IV - E en IV - H_3 ; fig. 9).
5. bijniercarcinoom, onafhankelijk van de symptomatologie, is gekenmerkt door een zeer hoge excretie van H_4S (fig. 12), een zeer hoge F/B-ratio (fig. 9) en de aanwezigheid van grote hoeveelheden onbekende substanties, o. a. Y_a en Y_2 (par. IV - H_{1-2}).

Viriliserend carcinoom heeft daarnaast enkele karakteristieken gemeen met het benigne adrenogenitaal syndroom (opvallend laag percentage cortisol-metabolieten).

Carcinoom dat een typisch syndroom van Cushing teweegbrengt, is gekenmerkt door een extreem hoge excretie van cortisol en zijn metabolieten.

Een versterkte excretie van biologisch actieve corticosteroiden in combinatie met een verminderde excretie van tetrahydro-metabolieten wijst op een abnormale metabolisering van de hormonen (spectrum 13; par. IV - F). Uit deze voorbeelden blijkt dat de bepaling van alleen metabolieten of van alleen hormonen tot foutieve conclusies kan leiden.

De volgende waarnemingen zijn van meer theoretisch belang:

1. waarnemingen die kunnen worden geïnterpreteerd met behulp van een biosynthese-schema dat oorspronkelijk werd opgesteld op grond van de uitkomsten van in vitro-proeven:
 - a. een chronisch versterkte behoefte aan cortisol (M. Addison; adrenogenitaal syndroom) leidt via continu verhoogde ACTH -stimulatie tot een hoge F/B-ratio (zeer waarschijnlijk te imiteren door een langdurige stimulatie met exogeen ACTH).

Dit is te verklaren door een verschuiving aan te nemen ten gunste van de synthese-reeks: 17-hydroxy-progesteron \rightarrow Reichstein's S \rightarrow cortisol (par. IV - J).

Indien er geen sprake is van een enzymblokkering in deze reeks (M. Addison; stimulatie met exogeen ACTH), dan wordt de hoge F/B-ratio begeleid door een verhoogde

"secretie" van Reichstein's S, waarschijnlijk door overbelasting van het 11-hydroxyleringssysteem (par. IV - K). Is er wel een enzymblokkering, zoals bij de patienten met adrenogenitaal syndroom (defect van de 21-hydroxylering), dan wordt er geen overmaat S, maar een overmaat 17-hydroxy-progesteron "gesecerneerd" (par. IV - H₂).

- b. een versterkte behoefte aan mineralocorticoiden (secundair hyperaldosteronisme) leidt, mogelijk via verhoogde "glomerulotrophine"-stimulatie, tot een lage F/B-ratio. Eenzelfde resultaat wordt bereikt door een kortdurende stimulatie met exogeen ACTH.

Dit is te verklaren door een verschuiving aan te nemen ten gunste van de synthese-reeks: DOC → corticosteron → aldosteron (par. IV - J).

Uit spectrum 13^a blijkt dat de combinatie ACTH- en glomerulotrophine-stimulatie tot een versterkte secretie van DOC kan leiden, waarschijnlijk door overbelasting van het 11-hydroxyleringssysteem (vgl. het analoge gebeuren in de andere reeks).

- c. een blokkering van de 11-hydroxylering met behulp van SU-4885 leidt tot een versterkte secretie zowel van DOC als van Reichstein's S (par. IV - I₂). Ook deze waarneming is met behulp van het synthese-schema te verklaren.

2. waarnemingen betreffende de stofwisseling van de hormonen:

- a. onder normale omstandigheden is H₄E kwantitatief de belangrijkste metaboliet van cortisol; de H₄F/H₄E-ratio is dan ook < 1. Een sterke (snelle) toename van de secretie van cortisol (ACTH-stimulering; soms bijniercarcinoom) resulteert in een verschuiving van het metabolisme ten gunste van H₄F, waardoor een omkering van de ratio optreedt (par. IV - I₁; spectrum 27).

- b. over het algemeen is allo-H₄B in kwantitatief opzicht de belangrijkste metaboliet van corticosteron, al zijn er talrijke uitzonderingen op deze regel.

- c. H₄S is een belangrijke metaboliet van Reichstein's S. Er zijn aanwijzingen dat bij zeer grote productie van Reichstein's S (onder invloed van SU-4885) ook allo-H₄S wordt gevormd (par. IV - I₂).

- d. bij ernstige leverbeschadiging (cirrhose) en bij neonati (nog onvolwaardige leverfunctie) is de vorming van tetrahydro-metabolieten gestoord. De vorming van 11-dehydro-metabolieten schijnt minder gebonden te zijn aan een intacte leverfunctie (spectrum 13; par. IV - F).

3. waarnemingen betreffende de aldosteronsecretie.

- a. na hypophysectomie gaat de secretie van aldosteron door, aanvankelijk zelfs in versterkte mate (spectrum 21).

- b. stimulering van de bijniere met exogeen ACTH heeft over het algemeen slechts een zeer gering en kortdurend effect op de aldosteronsecretie (par. IV - I₁).
- c. alleen wanneer de bijnierschorsactiviteit onder invloed van een fysiologische stimulans ("glomerulotrophine") reeds is gericht op de productie van grote hoeveelheden aldosteron, schijnt de stimulatie met exogeen ACTH een veel groter effect te hebben (spectrum I₃^a).

De aldosteronsecretie is dus in grote mate onafhankelijk van de adenohipofyse.

- 4. waarnemingen betreffende de corticosteronsecretie.
 - a. ACTH (nauwelijks effect op de aldosteronsecretie) stimuleert de productie van corticosteron in aanzienlijke mate.
 - b. "glomerulotrophine" (geen effect op de F-secretie) stimuleert de productie van corticosteron eveneens.

De secretie van corticosteron schijnt dus universeeler te worden gereguleerd dan de secretie van cortisol of aldosteron (par. IV - L).

Uit de verkregen resultaten kan worden afgeleid dat een spectrumbepaling vaak een beter inzicht geeft in de fysiologie en pathologie van de hormoonproductie en -metabolisering dan met de gebruikelijke routine steroidbepalingen mogelijk is. Speciaal veranderingen in de corticosteronsecretie en pathologische en iatrogene blokkeringen van de biosynthese der corticosteroiden zijn voor nauwkeuriger onderzoek toegankelijk geworden.

De methodiek levert hierdoor een bijdrage tot verfijning van de diagnostiek van afwijkingen in het hypofyse-bijnier-systeem.

SUMMARY.

In this thesis a method is described for estimating urinary corticosteroid patterns.

The steroids to be discussed and the abbreviations used to indicate them are summarized in table I.

The method (chapter III) consists of the following steps.

1. Urine collection.

The urine is collected for 24-hour periods without adding a preservative and is analyzed or frozen immediately after collection.

One half of the 24-hour urine is used for estimating aldosterone (method of Neher and Wettstein, 1956, slightly modified); another aliquot (usually 1/5 of the 24-hour urine) is used for estimating the corticosteroid pattern; the remaining urine is used for determination of the total 17-hydroxysteroids and 17-ketosteroids (method of Appleby-Norymberski, 1955).

2. Hydrolysis.

1/5 of the 24-hour urine is incubated for 48 hours at 37°C and pH 4.8 with β -glucuronidase (400 units per ml) and sulfatase (200 units per ml) from *Helix pomatia* digestive juice (l'Industrie Biologique Française, Gennevilliers).

3. Extraction.

At the end of the incubation period the urine is acidified with hydrochloric acid to pH 1.0 and saturated with sodium chloride. In a mechanical shaker the urine is extracted 5 times with 1/3 volume of purified chloroform in the course of 24 hours. In this way the enzymatic hydrolysis is supplemented by an acid hydrolysis during the extraction period.

4. Purification of the extract.

The combined and cooled chloroform extracts are washed successively with 0.05 volume 1.0 N NaOH (cooled to 4°C); 0.05 volume 0.1 N NaOH (cooled to 4°C); 2 x 0.05 volume saturated NaCl-solution. The wash fluids are not re-extracted.

The purified neutral chloroform extract is dried over sodium sulfate and evaporated at 50°C in vacuo to nearly dryness. The residue is quantitatively transferred to a pointed test-tube and evaporated to dryness in a stream of nitrogen at 50°C. The dry residue is redissolved in a measured amount of chloroform and divided into two equal parts.

5. First paperchromatographic separation.

The two identical extracts are simultaneously chromatographed on two separate paperstrips in the system propylene glycol/toluene (Burton c. s., 1952; Richardson c. s., 1955). In three phases the extracts are divided in nine (sometimes eleven) steroid fractions (fig. 3).

The chromatograms (Whatman No. 1 paper) consist of four separate strips the end being cut to a point; the length from the starting lines downwards is 41 cm (phase I and III) resp. 45 cm (phase II).

The chromatograms are impregnated with 30% propylene glycol in acetone, blotted between double filterpaper and loaded as follows.

Phase I: the two identical extracts, each representing 1/10 of the 24-hour urine are dissolved in $\pm 100 \mu\text{l}$ chloroform/methanol 1 : 1 and applied quantitatively to the starting lines of the two medial strips (extract strips; $2\frac{1}{2}$ cm wide). The reference steroids H_4F , H_4E , F and E ($\pm 5 \mu\text{g}$ of each), dissolved in methanol, are applied to the starting lines of the two lateral strips (indicator strips; $1\frac{1}{2}$ cm wide), together with the blue indicator dye F_{14} (Ciba).

The chromatogram is developed with 100 ml toluene in a Shandon chromatography tank at 28°C after an equilibrating time of one hour. The overflow of the extract strips is collected into two small glass containers placed under the medial strips.

The end of the first phase is reached after about 70 hours when the front of the blue dye has travelled about 30 cm.

Phase II: The overflow of phase I is concentrated to a small volume and chromatographed in the same manner with 50 ml toluene. Now the reference steroids H_4B , H_4A and B ($5 \mu\text{g}$ of each) as well as the red indicator dye F_5 (Ciba) are run on the indicator strips. This second phase is finished when the front of the indicator dye has travelled about 25 cm (after about 15 hours).

Phase III: The overflow of phase II is chromatographed in the same manner with 50 ml toluene. Now A and DOC are used as reference steroids.

This phase is completed when the solvent front has reached the end of the paper (after about 3 hours).

6. Localisation of the steroid fractions on the chromatograms.

After drying overnight the complete chromatograms are photographed using UV light: the chromatogram is pressed on Document contact paper and exposed during about 7 seconds to the light of a Philips TUV 15 W lamp, placed at a distance of about 1 m.

By the localisation of UV absorbing material on the extract

strips one can determine if the separation of the steroids on the two strips has taken place in an identical manner. Next, the left extract strip and the two indicator strips are subjected to the blue tetrazolium reaction (BT-reaction) and the sodium hydroxide fluorescence test of Bush (Fl-reaction). The results (fig. 3) are marked on the UV fotocopy which now gives sufficient information to determine the position of the steroid fractions on the right extract strip. This untouched strip can be divided into the corresponding fractions for further separation, identification and quantitative estimation of the steroids.

7. Elution procedure.

Each paper fraction is cut into small pieces and shaken to pulp with 25 ml distilled water in a separating funnel of 100 ml. This pulp is extracted 5 times (fractions I/I and I/II) resp. 3 times (the other fractions) with 15 ml chloroform. The combined chloroform extracts are washed with 20 ml distilled water, dried over sodium sulfate and concentrated to a small volume. The residue is quantitatively transferred to a pointed test tube and evaporated in a stream of nitrogen at 50°C to dryness.

8. Second paperchromatographic separation.

Each eluted steroid fraction is once again subjected to chromatography, the four fractions of phase I in system Bush C, the other fractions in system B₁ (table page 56). For this purpose we used a sheet of Whatman No. 1 paper (19 x 46 cm) that has been cut into eight strips 1 cm apart. The strips are 1½ cm wide and 40 cm long; the starting lines are drawn 36 cm from the free end.

A maximum of 5 strips is used as extract strips; the 3 strips in between are used as indicator strips.

A specially chosen short dilution range (1/2 - 1/4 - 1/8 etc.) of one or more of the steroid fractions is applied to the starting lines of the extract strips. Evaporation of the solvent (methanol/chloroform 1 : 1) is facilitated by a jet of nitrogen.

The indicator strips are reserved for one or two appropriate reference steroids in precisely measured amounts (1½ - 2½ - 5 µg). For this purpose every two months fresh standard solutions of reference steroids in methanol are prepared (5 µg/10 µl) and kept in rubber stopped vials. With an Agla micrometer syringe 2½ resp. 5 resp. 10 µl are applied to the starting lines.

The chromatograms are developed at 28°C in Shandon chromatography tanks after equilibrating overnight.

The duration of the development depends on the polarity of the fractions.

After the development the chromatograms are dried in a stream of warm air and subjected to the BT- and Fl-reactions. The isolated steroids can be estimated by visual comparison of the coloured spots with the corresponding spots of reference steroids of known concentration.

The second chromatography, necessary for a reliable separation and identification, gives at the same time quantitative results and is the end of the procedure.

By multiplying the estimated values one can calculate the total amount of each steroid excreted in 24 hours.

In the table on page 56 is indicated for each fraction

the reference steroids used,

the required time of development,

the range of dilution, to be used when normal amounts of steroids are expected.

Fraction II/II is chromatographed parallel with H_4A because we could not obtain the reference steroid allo- H_4B .

Our complete results are summarized in the synopsis at the back. Mean values of the important steroids and some calculated ratio's are given in the tables IV - XII.

The steroids H_4F , H_4E , F, E, H_4S , H_4B , H_4A , S, B, A and DOC were identified by direct comparison with authentic steroids (BT-reaction, Fl-reaction and R_f -values in at least three different systems).

The identity of the steroids allo- H_4F , Reichstein's U, allo- H_4B and H_4DOC is somewhat less certain, because direct comparison with authentic reference steroids was not possible; the reaction in the BT-test and fluorescence-test and the relative R_f -values in at least three different systems were however in accordance with published data.

The following unknown substances were isolated rather frequently:

in fraction I/III:

X_1 : BT + Fl -, R_f in system Bush C 0,8

X_2 : BT + Fl -, ,, ,, 1,1

X_3 : BT - Fl + ,, ,, 1,25

In certain cases of adrenal hyperfunction some additional substances can be found in this fraction:

X_a : BT + Fl +, R_f in system Bush C 1,0

X_b : BT + Fl + ,, ,, 1,5

X_c : BT + Fl - ,, ,, 2,0

in fraction I/IV:

X_4 : BT + (green-blue) Fl + (blue),

R_f in system Bush C 0,6:

Aldosterone can be found in this fraction when its excretion is definitely increased. R_f in system Bush C 0,7.

The values of aldosterone excretion given in Tables IV - XII are obtained with the method of Neher and Wettstein.

in fraction II/I:

Y_1 : BT + Fl + or -, Rf_{H_4B} in system B_1 0, 3 - 0, 5

Y_a : BT + Fl - " " " 1, 4

(just like allo- H_4B from fraction II/II).

in fraction II/III:

Y_2 : BT + Fl -, Rf_{H_4A} in system B_1 1, 4 (allo-H A??)

in fraction II/IV:

Y_3 : BT + Fl -, Rf_B in system B_1 0, 75

Y_4 : " " " 1, 3

Y_5 : " " " 1, 6

Y_6 : " " " 2, 3

in fraction III/I (not always present):

Z_a : BT + Fl +, Rf_A in system B_1 0, 7

Z_b : BT + Fl - " " 1, 6

in fraction III/II:

Z_1 : BT + Fl -, Rf_A in system B_1 0, 6

Z_2 : BT + Fl - " " 2, 0 (H DOC??)

The recovery of authentic steroids added to one of two identical aliquots of urine is given in table II.

In table III the sum of individually estimated 17-hydroxy-steroids(H_4F + H_4E + allo- H_4F + U + E+F + H_4S + S) is compared with the total 17-hydroxysteroids measured as a group (method of Appleby-Norymberski) in the same 24-hour urine.

Usually the former accounts for 30% of the latter. Under the influence of ACTH the percentage increases. This is considered to be due to

1. a shift in the metabolism of F and S to metabolites with an α -ketolic side chain.
 2. a decrease of the influence of non-specific chromogens on the group reaction because of the high steroid concentration.
- In the adrenogenital syndrome the percentage is very low (<10%) because of large amounts of 21-desoxy-17-hydroxy-steroids. Therefore this group of steroids can be estimated indirectly by comparing the two groups of 17-hydroxysteroids.

Urinary corticosteroid patterns were obtained from:

1. six normal control persons (synopsis, table IV, diagrams 1 and 2).
2. eight patients without pituitary or adrenal disease (synopsis, table V).

Two of them had secondary aldosteronism.

- a. Case 12 is a girl with congenital hypoprothrombinemia. Oneach of the three days preceding the urine collection extraction of some teeth was performed that caused rather severe bleeding.

Not only is the aldosterone excretion high, but also the excretion of B and its metabolites (B-group). The F/B-ratio is very low.

- b. Case 13 is a boy with severe cirrhosis of the liver; about 10 l ascites fluid had to be removed every two weeks. The high excretion of biologically active steroids and the low excretion of metabolites (diagram 3) are manifestations of a deranged metabolism of the hormones. The excretion of aldosterone is very high. This is presumably due to an increased production as well as a decreased metabolism.

According to Peterson (1960) the production of both F and B is low in cases of moderately severe cirrhosis of the liver. Our findings agree with this only as far as F is concerned (low excretion of the F-group).

The excretion of the B-group however is relatively high (low F/B-ratio). Therefore we suppose an increase in the production of B because of the requirement for mineralocorticoids in the decompensated phase of the disease.

The six other patients in this group are considered to have a normal adrenal function.

The normal steroid excretion values given in the pattern on page 81 are derived from the results obtained in these six patients and the six normal control persons. This normal excretion pattern will be used as a standard for evaluating the steroid excretion in pathological cases.

3. Three newborn babies without adrenal disease (synopsis, table VI).

Apart from the very low total excretion of steroids the patterns differ in three respects from those of normal adults:

- a. the very low excretion of tetrahydrometabolites in comparison with the excretion of biologically active steroids. In this respect the patterns resemble that obtained from the patient with cirrhosis of the liver.
- b. the low H_4F/H_4E -ratio.

In case 16 this ratio is extremely low. We have good reason to assume an interference by a substance similar though not identical with H_4E .

- c. the low F/B-ratio. This will be discussed later on.

4. Patients with adrenal insufficiency (syopsis, table VII).

case 18: Addison's disease with marked changes in the water and electrolyte balance; etiology unknown.

case 19 : Addison's disease probably caused by adrenal tuberculosis with marked changes in the water and electrolyte balance (diagram 4).

case 20: Addison's disease probably caused by adrenal tuberculosis; no signs of impending crisis.

In all cases the urine was collected before substitution therapy was started. The excretion of all hormones and metabolites is very low. Only the excretion of H_4S is normal or even increased.

case 21: panhypopituitarism as a result of surgical removal of a large chromophobe adenoma.

case 22: panhypopituitarism due to a chromophobe adenoma (diagram 5).

case 23: panhypopituitarism possibly caused by encephalitis. Perhaps the high excretion of H_4S and the high F/B-ratio are connected with this uncommon etiology.

case 24: probable panhypopituitarism.

5. Patients with Cushing's syndrome (synopsis, table VIII).

case 25: typical syndrome of long duration due to bilateral adrenal hyperplasia (diagram 6).

The pattern reveals a high excretion of the F-group, especially of the tetrahydrometabolites; the F/B-ratio is high. Aldosterone was not measured.

case 26: typical syndrome caused by adrenal carcinoma (diagram 7).

case 26^u: same patient after the development of a large metastasis in the liver.

case 27: typical syndrome caused by adrenal carcinoma.

The patterns of both patients reveal:

a. a very high excretion of the F-group, not only of the metabolites but also of the active steroids. The $H_4 F/H_4 E$ -ratio is high (case 27), also the F/E-ratio.

b. the excretion of the B-group is essentially normal; the F/B-ratio is very high.

c. the aldosterone excretion is zero.

d. the excretion of $H_4 S$ is very high; S itself is present.

e. a number of unknown substances could be isolated, among others:

1) a substance in fraction II/I that behaves like Y_a

2) a substance in fraction II/III that behaves like Y_2

3) a few substances in phase III that contained more fractions than usual.

case 28: probable Cushing's syndrome.

Even at complete rest in bed the excretion of the F-group is rather high; also the F/B-ratio is rather high.

case 29: Cushing's syndrome (clinically) cured after extirpation of a pituitary adenoma.

The pattern is normal.

6. Patients with adrenogenital syndrome (synopsis, table IX).

case 30: typical syndrome associated with adrenal hyperplasia (diagram 8).

case 31: typical syndrome probably associated with adrenal hyperplasia.

In both cases the excretion of both the F-group and the B-group is within the lower range of normal. The F/B-ratio is rather high. The excretion of 21-desoxysteroids must be

very high (low percentage of α -ketolic steroids, table III).
 case 32: adrenogenital syndrome due to adrenal carcinoma. The pattern reveals several characteristics of adrenal carcinoma (very high excretion of H_4S ; very high F/B-ratio; high excretion of substances Y_a and Y_2) as well as characteristics of adrenogenital syndrome (low percentage of α -ketolic steroids, table III).

7. Patients with pathological aldosteronism (synopsis, table X).

case 33: typical Conn's syndrome caused by an adrenal adenoma (diagram 9).

case 34 and case 35: malignant hypertension with a biochemical pattern like that of Conn's syndrome; bilateral adrenal hyperplasia.

In all three cases the excretion of aldosterone is too high. The excretion of the F-group and the F/B-ratio are low.

case 36 and case 37: observation Conn's syndrome; no diagnosis.

case 38: Conn's syndrome cured after subtotal adrenalectomy.

Normal pattern.

8. Response to ACTH (synopsis, table XI).

Six individuals with normal or pathological adrenal function were stimulated on one or two days with 25 mg ACTH (Cortrophine, Organon) in an eight hour i. v. infusion. With the exception of case 20 (M. Addison) the patterns reveal:

a. a marked increase in the excretion of all hormones and metabolites (fig. 4). The increase is rather delayed in case 23 (fig. 6) but very rapid in case 28 (fig. 5).

b. a marked increase of the H_4F/H_4E -ratio and the F/E-ratio.

c. in cases 28, 13 and 23 Reichstein's S appears in the urine. The excretion of its tetrahydrometabolite increases markedly in all cases.

d. on the first day of stimulation the F/B-ratio decreases in all cases. On the second day there seems to be a return to a normal ratio.

e. the excretion of aldosterone is somewhat increased. As early as the second day the excretion is decreased below the basal values. The 5-fold increase of aldosterone in case 13 (secondary aldosteronism) seems to indicate that the adrenal secretory state before administration of ACTH is a factor determining its reaction upon stimulation. In this case DOC was also isolated after stimulation.

9. Response to SU-4885.

The influence of SU-4885 (Metopiron, Ciba) on adrenocor-

tical biosynthesis was investigated in two individuals receiving 3 x 2 Gm/daily perorally during two days.

a. case 40 is a woman with normal adrenal and pituitary function. The results are given in the synopsis, table XII and diagrams 10 and 11. In fraction II/I an unknown BT + F1 - substance was isolated: 480 μ g on the first day and 960 μ g on the second day; the Rf_{H_4B} in system Bush B₁ is 1,6. It is possible that this substance is allo-H₄S; proof of this is lacking.

b. case 23 is a man with panhypopituitarism.

The diminished pituitary-ACTH-reserve is evident from the results given in the synopsis and table XII.

Fig. 8 illustrates the difference in response to SU-4885 of the two investigated individuals.

The increase of the S-group in the normal case is about 150 times the basal value on the first day; in the case of panhypopituitarism the increase is only 7 times the basal value. These preliminary results seem to indicate that the SU-4885-test for estimating pituitary-ACTH-reserve may be made more sensitive by using the excretion of H₄S as a criterium instead of one of the routine group determinations (17-ketogenic steroids; total 17-hydroxy-steroids).

The significance of the F/B-ratio (fig. 9).

The F/B-ratio as calculated in this study is the urinary excretion of H₄F + allo-H₄F + H₄E + F + E compared with the excretion of H₄B + allo-H₄B + H₄A + B + A.

From this ratio certain conclusions can be drawn assuming that

1. the two groups of similar steroids represent about the same percentage of the total secreted amount of F and B.
2. a possible shift in the metabolism (in favour of metabolites that cannot be estimated with the method used) under the influence of altered secretion or deranged metabolism (cirrhosis of the liver, newborn babies) applies to the B-metabolites as well as to the F-metabolites.

The mean normal ratio is 6,3 (range 3,7 - 10,8).

A low ratio was found:

1. in cases with physiological secondary aldosteronism (case 12, ratio 2,2; case 13, ratio 3,1).

It is suggested that the low ratio is the result of a shift in steroid biosynthesis in favour of the sequence: progesterone \rightarrow DOC \rightarrow B \rightarrow aldosterone, caused by an increased demand for mineralocorticoids. This may mean that the secretion of B can be stimulated by disturbances in the fluid balance of the body.

2. in primary aldosteronism and pathological secondary aldosteronism (case 33, ratio 3,1; case 34, ratio 2,7; case 35, ratio 3,3).

In these cases too the decrease of the ratio is possibly connected with a shift in favour of the production of mineralocorticoids.

3. in newborn babies (case 15, ratio 2, 3; case 17, ratio 1, 0). Especially in these cases the interpretation of the F/B-ratio is rather hazardous because of the fundamental differences in metabolism between infants and adults.

Still we may conclude that our preliminary results are in accordance with the hypothesis of Eagle and Wolfson (1954) that B may be a more important hormone in children than in adults.

4. during a short stimulation by ACTH (table XI). These observations indicate that B plays an important role in the reaction of the adrenals to acute stimulation. It is highly probable that a prolonged ACTH stimulation reverses the F/B-ratio till normal or even high values (Dohan c. s. 1955).

A high ratio was found:

1. in Cushing's syndrome caused by hyperplasia (case 25, ratio 12; case 28 ?, ratio 9, 3).
2. in adrenogenital syndrome (case 30, ratio 12; case 31, ratio 14).
3. Addison's disease caused by tuberculosis (case 20, ratio 13, 5 - 17, 4) with the exception of cases in the terminal stage (case 19, ratio 3, 8).

In all cases the high ratio seems to be related to a prolonged stimulation by endogenous ACTH. A possible explanation for the high ratio in case 23 is given on page 164.

An exceptionally high ratio was found in the cases with adrenal carcinoma (case 26, ratio \pm 30; case 27, ratio \pm 30; case 32, ratio \pm 46).

The significance of the F/S-ratio.

H₄S was found without exception in more than 60 examined urines. The S-group (H₄S + S) usually represents 1-3% of the sum of excreted steroids H₄F + allo-H₄F + H₄E + F + E + H₄S + S. Therefore it may be assumed that normally about 1-3% of the precursor S is lost by the adrenals before the 11-hydroxylation can take place.

This percentage was found to be much higher in the following conditions:

1. adrenal insufficiency, especially Addison's disease (fig. 10). In the patients with Addison's disease, especially the two cases of known etiology (adrenal tuberculosis) steroid synthesis presumably proceeds at a very high rate in the intact parts of the adrenals under the influence of increased endogenous ACTH. This in turn may cause overburdening of the 11-hydroxylation capacity resulting in an increased loss of the "incomplete" steroid compound S by the adrenals (see point 2).

In the patient with panhypopituitarism an influence of the pituitary gland on the adrenals seems quite improbable unless one takes into consideration the etiology of this case. In this subject with postencephalitis panhypopituitarism the pituitary insufficiency is possibly secondary to a disturbance of a higher center and not to destruction of the pituitary gland itself. It is possible that a residual pituitary hormone production may provide an explanation for the unusual findings (high F/B-ratio and high H_4S -excretion) in this patient (case 23).

2. stimulation of the adrenals by exogenous ACTH. With the exception of the patient with Addison's disease all individuals react with an increase of the S-group excretion surpassing the increase of the F-group excretion (fig. 11).

3. adrenal carcinoma (fig. 12).

Three patients with Cushing's syndrome or adrenogenital syndrome excreted very large amounts of H_4S ; all three of them (cases 26, 27 and 32 had an adrenal carcinoma, two with proven metastases.

One, possibly two patients with Cushing's syndrome (cases 25 and 28) and two patients with adrenogenital syndrome (cases 30 and 31) excreted normal amounts of H_4S ; all four of them had adrenal hyperplasia.

In the literature eight patients were described with adrenal hyperfunction and a very high excretion of H_4S . In six cases the syndrome was caused by an adrenal carcinoma.

4. inhibition of 11β -hydroxylation by SU-4885 (table XII, diagrams 10 and 11).

Conclusions.

1. Prolonged stimulation with exogenous or endogenous (Addison's disease, adrenogenital syndrome) ACTH results in a high F/B-ratio. Apart from the adrenogenital syndrome the high ratio is associated with a high excretion of H_4S , presumably because of overburdening of the 11 -hydroxylating system.

In the case of the adrenogenital syndrome (deficiency of 21 -hydroxylase) metabolites of 17 -hydroxy-progesterone accumulate instead of H_4S in the urine.

2. Short stimulation with exogenous ACTH or stimulation with "glomerulotrophine" (secondary aldosteronism) result in a low F/B-ratio. The combination of these stimuli provokes in addition to the low ratio an increased secretion of DOC (case 13^a) presumably because of overburdening of the 11 -hydroxylating system.

3. Aldosterone production is only slightly and temporarily stimulated by exogenous ACTH unless the adrenals are

already producing large amounts of aldosterone as in physiological secondary aldosteronism (case 13^a). During a short period after hypophysectomy aldosterone secretion is increased.

4. Corticosterone production can be stimulated practically independently of aldosterone by mechanisms stimulating cortisol production (ACTH); on the other hand corticosterone production can be stimulated independently of cortisol by mechanisms stimulating aldosterone production ("glomerulotrophine").
5. Usually H_4E is the most important α -ketolic metabolite of cortisol; the H_4F/H_4E -ratio is <1 .
During accelerated secretion of cortisol (ACTH-stimulation; sometimes adrenal carcinoma) much more H_4F is produced resulting in a H_4F/H_4E -ratio >1 .
6. Allo- H_4B is often but by no means always the most important α -ketolic metabolite of corticosterone.
7. During accelerated secretion of Reichstein's Compound S (suppression of cortisol synthesis by SU-4885) allo- H_4S may be excreted.
8. An impaired function of the liver (severe cirrhosis, massive metastatic invasion of the liver, newborn infants) results in a low excretion of tetrahydrometabolites in addition to a high excretion of biologically active steroids.
9. Adrenal cortical insufficiency is characterized by a low excretion of all hormones and their metabolites.
If the excretion of cortisol and its metabolites is within the normal range a high excretion of H_4S and a high F/B-ratio may indicate adrenal insufficiency.
10. In the adrenogenital syndrome cortisol and its metabolites account for less than 10% of the total 17-hydroxysteroids.
11. In addition to the excretion of large amounts of unidentified compounds an exceptionally high excretion of H_4S is one of the principal characteristics of adrenal carcinoma producing either a Cushing's syndrome or an adrenogenital syndrome.
12. In the SU-4885 test for evaluating pituitary ACTH-reserve the estimation of H_4S excretion seems to be a very sensitive criterium.

The data obtained in this investigation show that a quantitative corticosteroid excretion pattern in urine gives much more information about physiology and pathology of adrenal cortical hormone production and metabolism than the group determinations of steroids.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR.

- Appleby, J. I., Gibson, G., Norymberski, J. K.: *Biochem. J.* 60, 453, 1955.
- Ayres, P. J., Garrod, O., Tait, S. A., Tait, J. F., Walker, G., Pearlman, W. H.: *Ciba Found. Coll. Endocr.* 11, 309, 1957.
- Ayres, P. J. in: *The biosynthesis and secretion of adrenocortical steroids* (Ed. Clark, F., Grant, J. K.), Cambridge University Press, 1960.
- Baulieu, E. -E., Jayle, M. -F.: *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* 39, 37, 1957.
- Baulieu, E. -E., Robel, P., Siguier, F., Jayle, M. -F.: *J. clin. Endocr.* 19, 1081, 1959.
- Beall, D., Reichstein, T.: *Nature (Lond.)* 142, 479, 1938.
- Bondy, Ph. K., Upton, G. V.: *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 94, 585, 1957.
- Bongiovanni, A. M., Eberlein, W. R.: *J. clin. Endocr.* 15, 1524, 1955.
- Bongiovanni, A. M., Eberlein, W. R., Caddell, J. L.: *J. clin. Invest.* 37, 1087, 1958.
- Bongiovanni, A. M., Eberlein, W. R., Darrell Smith, J., Mc Padden, A. J.: *J. clin. Endocr.* 19, 1608, 1959.
- Bradlow, H. L., Gallagher, T. F.: *J. biol. Chem.* 229, 505, 1957.
- Buchem, F. S. P. van, Doorenbos, H., Elings, H. S.: *Ned. T. v. Geneesk.* 100, 1836, 1956.
- Burstein, S., Savard, K., Dorfman, R. I.: *Endocrinology* 53, 88, 1953.
- Burton, R. B., Zaffaroni, A., Keutmann, E. H.: *J. biol. Chem.* 188, 763, 1951.
- Burton, R. B., Zaffaroni, A., Keutmann, E. H.: *J. biol. Chem.* 193, 769, 1951.
- Bush, I. E.: *Biochem. J.* 50, 370, 1952.
- Bush, I. E.: *J. Endocr.* 9, 95, 1953.
- Bush, I. E., Sandberg, A. A.: *J. biol. Chem.* 205, 783, 1953.
- Bush, I. E., Swale, J., Patterson, J.: *Biochem. J.* 62, 16^P, 1956.
- Bush, I. E., Willoughby, M.: *Biochem. J.* 67, 689, 1957.
- Caspi, E., Hechter, O.: *Arch. Biochem. Biophys.* 61, 299, 1956.
- Chart, J. J., Sheppard, H., Allen, M. J., Bencze, W. L., Gaunt, R.: *Experientia (Basel)* 14, 151, 1958.
- Chen, C., Wheeler, J., Tewell, H. E.: *J. Lab. clin. Med.* 42, 749, 1953.
- Conn, J. W.: *J. Lab. clin. Med.* 45, 6, 1955.

- Cope, C. L., Hurlock, B.: Clin. Sci. 13, 69, 1954.
Cope, C. L., Black, E. G.: Clin. Sci. 17, 147, 1958.
Cope, C. L., Black, E. G.: Brit. med. J. II, 1117, 1959.
Coppage, W. S., Island, D., Smith, M., Liddle, G. W.: J. clin. Invest. 38, 2101, 1959.
Corcoran, A. C., Page, I. H.: J. Lab. clin. Med. 33, 1326, 1948.
Cox, R. I.: Biochem. J. 52, 339, 1952.
Cox, R. I., Finkelstein, M.: J. clin. Invest. 36, 1726, 1957.
Cox, R. I.: Acta endocr. (Kbh.) 33, 477, 1960.
Crabbé, J., Reddy, W. J., Ross, E. J., Thorn, G. W.: J. clin. Endocr. 19, 1185, 1959.
Daughaday, W. H., Jaffe, H., Williams, R. H.: J. clin. Endocr. 8, 166, 1948.
Daughaday, W. H.: J. clin. Invest. 37, 511, 1958.
De Courcy, C., Bush, I. E., Gray, C. H., Lunnon, J. B.: J. Endocr. 9, 401, 1953.
Dohan, F. C., Touchstone, J. C., Richardson, E. M.: J. clin. Invest. 34, 485, 1955.
Dorfman, R. I.: Recent Progr. Hormone Res. 9, 5, 1954.
Dorfman, R. I.: Ciba Found. Coll. Endocr. 8, 112, 1955.
Dyrenfurth, I., Sybulski, S., Notchev, V., Beck, J. C., Venning, E. H.: J. clin. Endocr. 18, 391, 1958.
Eagle, J. F., Wolfson, W. Q.: J. Lab. clin. Med. 43, 831, 1954.
Eberlein, W. R., Bongiovanni, A. M.: J. biol. Chem. 223, 85, 1956.
Eberlein, W. R., Bongiovanni, A. M.: Metabolism 9, 326, 1960.
Ely, R. S., Hughes, E. R., Kelley, V. C.: J. clin. Endocr. 18, 190, 1958.
Engel, L. E., Carter, P., Springer, M. J.: Fed. Proc. 13, 204, 1954.
Farrel, G.: First International Congress of Endocrinology, Copenhagen, 1960. Advance abstracts of symposium lectures p. 57.
Finkelstein, M. F., Golberg, S.: J. clin. Endocr. 17, 1063, 1957.
Finkelstein, M. F.: Acta endocr. (Kbh.) 30, 489, 1959.
Froesch, E. R., Renold, A. E., Thorn, G. W.: Schweiz. med. Wschr. 89, 623, 1959.
Fukushima, D. K., Kemp, A. D., Schneider, R., Stokem, M. B., Gallagher, T. F.: J. biol. Chem. 210, 129, 1954.
Fukushima, D. K., Leeds, N. S., Bradlow, H. L., Kritschewsky, T. H., Stokem, M. B., Gallagher, T. F.: J. biol. Chem. 212, 449, 1955.
Fukushima, D. K., Meyer, E. D., Ashworth, E., Gallagher, T. F.: Fed. Proc. 15, 257, 1956.

- Fukushima, D.K., Gallagher, T.F.: J. biol. Chem. 229, 85, 1957.
- Gallagher, T.F.: Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna, 1958. Sympos.no. IV.
- Gallagher, T.F.: First International Congress of Endocrinology, Copenhagen, 1960. Advance abstracts of symposium lectures p. 93.
- Garrod, O., Simpson, S.A., Tait, J.F.: Lancet I, 860, 1956.
- Genest, J., Koiw, E., Beauregard, P., Nowaczynski, W., Sandor, Th., Brouillet, J., Bolté, E., Verdy, M., Marc-Aurelle, J.: Metabolism 9, 624, 1960.
- Gold, E.M., Di-Raimondo, V.C., Forsham, P.H.: Metabolism 9, 3, 1960.
- Gold, N.I., Macfarlane, D.A., Moore, F.D.: J. clin. Endocr. 16, 282, 1956.
- Gold, N.I., Singleton, E., Macfarlane, D.A., Moore, F.D.: J. clin. Invest. 37, 813, 1958.
- Gold, N.I.: Metabolism 8, 878, 1959.
- Grant, J.K., Forrest, A.P.M., Symington, T.: Acta endocr. (Kbh.) 26, 195, 1957.
- Grant, J.K. in: The biosynthesis and secretion of adrenocortical steroids (Ed. Clark, F., Grant, J.K.), Cambridge University Press, 1960.
- Gross, F.: Schweiz. med. Wschr. 89, 1, 1959.
- Heard, R.D.H., Sobel, H., Venning, E.H.: J. biol. Chem. 165, 699, 1946.
- Hechter, O., Pincus, G.: Physiol. Rev. 34, 459, 1954.
- Hellman, L., Bradlow, H.L., Adesman, J., Fukushima, D.K., Kulp, J.L., Gallagher, T.F.: J. clin. Invest. 33, 1106, 1954.
- Holnes, N.J., Lunnon, J.B., Gray, C.H.: J. Endocr. 14, 138, 1956.
- Hökfelt, B., Luft, R., Ikkos, D., Olivecrona, H., Sekkenes, J.: Acta endocr. (Kbh.) 30, 29, 1959^a.
- Hökfelt, B., Sjögren, B., Falkheden, Th.: Acta endocr. (Kbh.) 31, 175, 1959^b.
- Hudson, P.B., Lombardo, M.E.: J. clin. Endocr. 15, 324, 1955.
- Jenkins, J.S., Pothier, L., Reddy, W.J., Nelson, D.H., Thorn, W.G.: Brit. med. J. I. 398, 1959.
- Johnson, D.F., Heftmann, E., Hayden, A.L.: Acta endocr. (Kbh.) 23, 341, 1956.
- Kass, E., Hechter, O., Macchi, I.A., Mou, T.W.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 85, 583, 1954.
- Kessler, W.R., Borman, A.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 71, 486, 1958.
- Kinsella, R.A., Glick, J.H.: J. biol. Chem. 203, 1003, 1953.

- Klyne, W.: The chemistry of the steroids. Methuen, London, 1957.
- Laidlaw, J. C., Yendt, E. R., Gornall, A. G.: Metabolism 9, 612, 1960.
- Landau, R. L., Stimmel, B. F., Humphreys, E., Clark, D. E.: J. clin. Endocr. 14, 1097, 1954.
- Laragh, J. H., Ulick, S., Januszewicz, V., Deming, Q. B., Kelly, W. G., Lieberman, S.: J. clin. Invest. 39, 1091, 1960.
- Liddle, G. W., Island, D., Lance, E. M., Harris, A. P.: J. clin. Endocr. 18, 906, 1958.
- Lieberman, S., Hariton, L. B., Stokem, M. B., Studer, P. E., Dobriner, K.: Fed. Proc. 10, 216, 1951.
- Lombardo, M. E., Mc Morris, C., Hudson, P. B.: Endocrinology 65, 426, 1959.
- Migeon, C. J.: J. Pediat. 55, 280, 1959.
- Moolenaar, A. J.: Acad. Proefschrift, Leiden, 1958.
- Morris, C. J. O. R., Williams, D. C.: Ciba Found. Coll. Endocr. 8, 157, 1955.
- Mulrow, P. J., Cohn, G. L.: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 101, 731, 1959.
- Neher, R., Wettstein, A.: J. clin. Invest. 35, 800, 1956.
- Neher, R.: Chromatographie von Sterinen, Steroiden und verwandten Verbindungen, Elsevier, 1958^a.
- Neher, R. in: Advances in clinical chemistry (Ed. Sobotka, H., Stewart, C. P.), Academic Press Inc., New York, 1958^b. Vol. I, p. 127.
- Norymberski, J. K.: Nature (Lond.) 170, 1074, 1952.
- Norymberski, J. K.: Mém. Soc. Endocr. 2, 50, 1953.
- Nowaczynski, W. J., Koiw, E., Genest, J.: Canad. J. Biochem. 35, 425, 1957.
- Peterson, R. E., Wijngaarden, J. B.: J. clin. Invest. 34, 957, 1955.
- Peterson, R. E., Wijngaarden, J. B., Guerra, S. L., Brodie, B. B., Bunim, J. J.: J. clin. Invest. 34, 1779, 1955.
- Peterson, R. E., Karrer, A., Guerra, S. L.: Anal. Chem. 29, 144, 1957.
- Peterson, R. E.: J. clin. Invest. 39, 320, 1960.
- Peterson, R. E., Pierce, Ch. E.: J. clin. Invest. 39, 741, 1960.
- Pincus, G., Romanoff, E. B.: Ciba Found. Coll. Endocr. 8, 97, 1955.
- Reddy, W. J., Jenkins, D., Thorn, G. W.: Metabolism 1, 511, 1952.
- Reddy, W. J.: Metabolism 3, 489, 1954.
- Richardson, E. M., Touchstone, J. C., Dohan, F. C.: J. clin. Invest. 34, 285, 1955.

- Richardson, E.M., Bulaschenko, H., Dohan, F.C.: J. clin. Endocr. 18, 1399, 1958.
- Romani, J.D.: C.R. Soc. Biol. (Paris) 150, 644, 887 en 1928, 1956.
- Romani, J.D.: Sem. Hôp. Paris 35, 1004, 1959.
- Romani, J.D., Albeaux-Fernet, M., Chabot, J., Keller, A., Larrieu, H.: Presse Méd. 67, 1969, 1959.
- Romanoff, E.B., Hudson, P.B., Pincus, G.: J. clin. Endocr. 13, 1546, 1953.
- Romanoff, L.P., Selye, J., Rodriguez, R., Pincus, G.: J. clin. Endocr. 17, 1777, 1957.
- Ross, E.J., Crabbé, J., Renold, A.E., Emerson, K., Thorn, G.W.: Amer. J. Med. 25, 278, 1958.
- Rosselet, J.P., Overland, L., Jailir, J.W., Lieberman, S.: Helv. chim. Acta 37, 1933, 1954.
- Sandberg, A.A., Slaunwhite, W.R.: J. clin. Invest. 38, 1290, 1959.
- Sayers, G., Royce, P.C. in: Clinical endocrinology. I (Ed. Astwood, E.B.), Grune & Stratton, New York, 1960, p. 323.
- Schneider, J.J.: J. biol. Chem. 194, 337, 1952.
- Short, R.V. in: The biosynthesis and secretion of adrenocortical steroids (Ed. Clark, F., Grant, J.K.), Cambridge University Press, 1960.
- Simpson, S.A., Tait, J.F.: Endocrinologie 50, 150, 1952.
- Southcott, C.M., Sproule, V.A., McIntosh, H., Darrach, M.: Canad. J. Biochem. 36, 819, 1958.
- Speirs, R.S., Meyer, R.K.: Endocrinology 45, 403, 1949.
- Stanbury, S.W., Mahler, R.F.: Quart. J. Med. 28, 425, 1959.
- Starlinger, H., Tamm, J.: Klin. Wschr. 33, 1104, 1955.
- Stoner, H.B., Whiteley, H.J., Emery, J.L.: J. Path. Bact. 66, 171, 1953.
- Sweat, M.L., Abbott, W.E., Jefferies, W. McK., Bliss, E.L.: Fed. Proc. 12, 141, 1953.
- Sweat, M.L.: J. clin. Endocr. 15, 1043, 1955.
- Symington, J. in: The biosynthesis and secretion of adrenocortical steroids (Ed. Clark, F., Grant, J.K.), Cambridge University Press, 1960.
- Takeda, R.: Endocrinol. Japon. 3, 73, 1956.
- Talbot, N.B., Saltzman, A.H., Wixom, R.L., Wolfe, J.K.: J. biol. Chem. 160, 535, 1945.
- Thorn, G.W., Renold, A.E., Goldfien, A., Nelson, D.H., Reddy, W.J., Hertz, R.: New Engl. J. Med. 254, 547, 1956.
- Touchstone, J.C., Richardson, E.M., Bulaschenko, H., Landolt, I., Dohan, F.C.: J. clin. Endocr. 14, 676, 1954.

- Touchstone, J. C., Bulaschenko, H., Dohan, F. C.: J. clin. Endocr. 15, 760, 1955.
- Touchstone, J. C., Bulaschenko, H., Richardson, E. M., Dohan, F. C.: J. clin. Endocr. 17, 250, 1957.
- Touchstone, J. C., Bulaschenko, H., Richardson, E. M., Dohan, F. C.: Arch. Biochem. Biophys. 81, 5, 1959.
- Ulick, S., Laragh, J. H., Lieberman, S., Loeb, R. F.: Trans. Ass. Amer. Phys. 71, 225, 1958.
- Ungar, F., Dorfman, R. I.: 38th Meeting of the Endocrine Society, 1956.
- Venning, E. H.: Endocrinology 39, 203, 1946.
- Vermeulen, A.: Acta Endocr. (Kbh.) 26, 399, 1957.
- Vermeulen, A., Demeulenaere, L.: Rev. Franç. d'étud. Clin. & Biol. I, 398, 1957.
- Vermeulen, A.: Acad. Proefschrift, Gent, 1960.
- Weichselbaum, Th. E., Margraf, H. W.: J. clin. Endocr. 15, 970, 1955.
- West, H. F.: Acta med. scand. Suppl. 352, 1960.
- Zaffaroni, A., Burton, R. B., Keutmann, E. H.: Science 111, 6, 1950.

Overzichtstabel.

De excretie van de corticosteroiden en onbekende substanties is weer-gegeven in $\mu\text{g}/24$ uur.

Met een - teken is aangegeven dat de betreffende substantie niet tijdens de routine-procedure werd aangetoond; praktisch betekent dit dat de substantie niet of in te verwaarlozen hoeveelheid aanwezig is geweest. Een uitzondering hierop vormt $\text{allo-H}_4\text{F}$ dat altijd aantoonbaar bleek, toen er in een latere fase van het onderzoek bewust naar werd gezocht.

Het cijfer 0 is gebruikt om aan te duiden dat het betreffende steroid, ondanks intensief zoeken, niet kon worden aangetoond.

De getallen in parentheses in de kolommen van stadium II en III vertegenwoordigen onbekende substanties die niet identiek zijn met de steroiden die in deze kolommen thuishoren.

Opmerkingen.

- 1) In de B kolom is de discrepantie aangegeven die vaak werd waargenomen tussen de BT-reactie en de natronloog-fluorescentie.
- 2) De eerste drie fracties van stadium I ontbreken omdat de bepalingendoor aanwijsbare fouten onbetrouwbaar waren; toen de methodiek haar gestandaardiseerde vorm had bereikt, was van deze fracties geen materiaal voor duplo-bepalingen meer over.
- 3) Spectrum bepaald zonder aanvullende hydrolyse met zuur.
- 4) Overflow van stadium II verloren gegaan.
- 5) Overflow van stadium I verloren gegaan.
- 6) Spectrum bepaald na toediening van 4 mgr aldosteron in een 8 uren infuus.
- 7) Een groot deel van " $\text{allo-H}_4\text{B}$ " is waarschijnlijk Y_a .
In fractie III/II zijn behalve Z_2 nog twee substanties aanwezig:
 $80 \mu\text{g BT} + \text{Fl} +, \text{Rf}_A = 0,9$ (Bush B_1);
 $85 \mu\text{g BT} - \text{Fl} +, \text{Rf}_A = 1,6$ (, ,).
- 8) In fractie III/II zijn behalve Z_2 nog drie substanties aanwezig:
 $\text{BT } 880 \mu\text{g} \left. \begin{array}{l} \text{BT } 160 \mu\text{g} \\ \text{Fl } 1360 \mu\text{g} \end{array} \right\} \text{Rf}_A = 0,9$ (Bush B_1); $\text{BT } 160 \mu\text{g} \left. \begin{array}{l} \text{Fl } 360 \mu\text{g} \end{array} \right\} \text{Rf}_A = 1,2$ (Bush B_1);
 $\text{Fl } 520 \mu\text{g}, \text{Rf}_A = 1,6$ (Bush B_1).
 In fractie III/III zijn twee onbekende substanties aanwezig:
 $\text{BT } 200 \mu\text{g} \left. \begin{array}{l} \text{Fl } 800 \mu\text{g} \end{array} \right\} \text{Rf}_{\text{DOC}} = 0,9$ (Bush B_1); $\text{BT } 80 \mu\text{g}, \text{Rf}_{\text{DOC}} = 1,0$ (Bush B_1).
- 9) In stadium III drie fracties.
 In fractie III/I is o.a. een BT + Fl + substantie aanwezig ($1280 \mu\text{g}$), $\text{Rf}_A = 0,9$ (Bush B_1).
 In fractie III/II zijn behalve Z_2 nog twee substanties aanwezig:
 $\text{BT } 120 \mu\text{g} \left. \begin{array}{l} \text{Fl } 60 \mu\text{g} \end{array} \right\} \text{Rf}_A = 1,1$ (Bush B_1); $\text{Fl } 200 \mu\text{g}, \text{Rf}_A = 1,5$ (Bush B_1).
 In fractie III/II^a is een BT + substantie aanwezig ($200 \mu\text{g}$); $\text{Rf}_A = 1,9$ (Bush B_1).
- 10) Een deel van " $\text{allo-H}_4\text{B}$ " is waarschijnlijk Y_a .
- 11) In fractie I/III zijn nog twee BT + Fl + substanties aanwezig:
 $\text{Rf}_F = 0,3$ resp. $0,6$ (Bush C).
- 12) In fractie II/II is een onbekende BT + Fl - substantie aanwezig ($1120 \mu\text{g}$), $\text{Rf}_{\text{H}_4\text{A}} = 0,6$ (Bush B_1).
- 13) Normale controle-persoon.
 In fractie II/I is een BT + Fl - substantie aanwezig ($480 \mu\text{g}$), $\text{Rf}_{\text{H}_4\text{B}} = 1,6$ (Bush B_1).
 In fractie III/II is $480 \mu\text{g}$ " H_4DOC " aanwezig.
- 14) In fractie II/I is een BT + Fl - substantie aanwezig ($960 \mu\text{g}$), $\text{Rf}_{\text{H}_4\text{B}} = 1,6$ (Bush B_1).
 In fractie III/II is $2500 \mu\text{g}$ " H_4DOC " aanwezig.

Synopsis.

Excretion of corticosteroids and unknown compounds expressed in $\mu\text{g}/24$ hours.

A - sign is used to indicate that the substance was not found during routine investigation, which means that the excretion must have been practically zero. An exception is $\text{allo-H}_4\text{F}$ which was always found when it was deliberately searched for in a later phase of this study.

The figure 0 is used to indicate that the substance was not detected even after extensive investigation.

Figures in parenthesis in phase II and III indicate unknown substances not identical with steroids belonging there.

Remarks.

- 1) The results obtained with the fluorescence test are taken as the excretion value of B.
- 2) Three fractions of phase I are lost.
- 3) Pattern estimated without acidifying the urine to pH 1, 0.
- 4) Overflow of phase II lost.
- 5) Overflow of phase I lost.
- 6) Pattern estimated after giving the patient 4 mg aldosteron in an eight hour infusion.
- 7) Large part of "allo- H_4B " is probably identical with compound Y_a . In addition to compound Z_2 fraction III/II contains two unknown compounds:
 $80 \mu\text{g BT} + \text{Fl} +, \text{Rf}_A = 0,9$ (Bush B_1);
 $85 \mu\text{g BT} - \text{Fl} +, \text{Rf}_A = 1,6$ (Bush B_1).
- 8) In addition to compound Z_2 fraction III/II contains three unknown compounds:
 $\left. \begin{array}{l} \text{BT } 880 \mu\text{g} \\ \text{Fl } 1360 \mu\text{g} \end{array} \right\} \text{Rf}_A = 0,9$ (Bush B_1); $\left. \begin{array}{l} \text{BT } 160 \mu\text{g} \\ \text{Fl } 360 \mu\text{g} \end{array} \right\} \text{Rf}_A = 1,2$ (Bush B_1);
 $\text{Fl } 520 \mu\text{g}, \text{Rf}_A = 1,6$ (Bush B_1).
 Fraction III/III contains two unknown compounds:
 $\left. \begin{array}{l} \text{BT } 200 \mu\text{g} \\ \text{Fl } 800 \mu\text{g} \end{array} \right\} \text{Rf}_{\text{DOC}} = 0,9$ (Bush B_1); $\text{BT } 80 \mu\text{g}, \text{Rf}_{\text{DOC}} = 1,0$ (Bush B_1).
- 9) Phase III contains three fractions.
 Fraction III/I contains among others $1280 \mu\text{g}$ of a $\text{BT} + \text{Fl} +$ compound, $\text{Rf}_A = 0,9$ (Bush B_1).
 In addition to compound Z_2 fraction III/II contains two unknown compounds:
 $\left. \begin{array}{l} \text{BT } 120 \mu\text{g} \\ \text{Fl } 60 \mu\text{g} \end{array} \right\} \text{Rf}_A = 1,1$ (Bush B_1); $\text{Fl } 200 \mu\text{g}, \text{Rf}_A = 1,5$ (Bush B_1).
 Fraction III/II^a contains $200 \mu\text{g}$ of a $\text{BT} + \text{Fl} -$ compound, $\text{Rf}_A = 1,9$ (Bush B_1).
- 10) Part of "allo- H_4B " is probably compound Y_a
- 11) Fraction I/III contains two additional unknown substances, $\text{BT} + \text{Fl} +$, $\text{Rf}_F = 0,3$ respectively $0,6$ (Bush C).
- 12) Fraction II/II contains $1120 \mu\text{g}$ of a $\text{BT} + \text{Fl} -$ compound, $\text{Rf}_{\text{H}_4\text{A}} = 0,6$ (Bush B_1).
- 13) Normal individual.
 Fraction II/I contains $480 \mu\text{g}$ of a $\text{BT} + \text{Fl} -$ compound (allo- $\text{H}_4\text{S}?$), $\text{Rf}_{\text{H}_4\text{B}} = 1,6$ (Bush B_1).
 Fraction III/II contains $480 \mu\text{g}$ " H_4DOC ".
- 14) Fraction II/I contains $960 \mu\text{g}$ of a $\text{BT} + \text{Fl} -$ compound (allo- $\text{H}_4\text{S}?$), $\text{Rf}_{\text{H}_4\text{B}} = 1,6$ (Bush B_1).
 Fraction III/II contains $2500 \mu\text{g}$ " H_4DOC ".

OVERZICHTSTABEL-SYNOPSIS OF DATA

OVERZICHTSTABEL-SYNOPSIS OF DATA							STADIUM I - PHASE I														STADIUM II - PHASE II												STADIUM III - PHASE III								Opm. Remarks		
Nº Case	Naam Name	G S	L A	Diagnose Diagnosis	Diurese Diuresis (ml)	Datum Date	Fractie I Fraction I			Fractie II Fraction II		Fractie III Fraction III						Fractie IV Fraction IV				Fractie I Fraction I			Fractie II Fraction II		Fractie III Fraction III			Fractie IV Fraction IV						Fractie I Fraction I		Fractie II Fraction II			Fractie III Fraction III		
	.						H4F	H4E	"allo- H4F"	"U"	F	X1	Xa	X2	X3	Xb	Xc	X4	Ald.	E	H4S	Y1	H4B	Ya	"allo- H4B"	H4A	S	Y2	Y3	B	Y4	Y5	Y6	Za	Zb	Z1	A	Z2	DOC	1)			
1	C.-K.	♀	34	Normaal Normal	1300	V-1959	900	2240	-	25	80	-	-	20	50	-	-	100	-	135	50	-	320 400	-	300 360	160	-	65 40	5	BT 60-80 Fl 25-40	60	10	20 40	-	-	40	15	30 40	-	2)			
1 ^a	"	♀	34	"	520	IX-1959	320 400	1280 1280	-	10	40	-	-	10	25	-	-	5	-	35	30	-	120	50	240 200	80 70	-	100 70	20	BT 30 Fl 5	60	20	30	-	-	10	5	10	-				
2	C.	♂	34	"	1500	V-1959	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90	75	-	160 160 160	-	320 320 320	180 180 200	-	30	5	BT 120 Fl 10	40	40	-	-	-	-	5	10	-	3)				
2 ^a	"	♂	34	"	760	IX-1959	640 640 960	2400 2560 3200	-	40	60 50	10	-	20	80 100	-	-	30	-	80	55	-	200 200 160	-	320 280 280	200 160 160	-	80 80	40	BT 150 Fl 20	-	25	20	-	-	-	20	20		-			
2 ^b	"	♂	34	"	"	"	800 800	2500 3200	-	40	60 50	10	-	15	50 60	-	-	25	-	80	60	-	200 200	-	320 280	220 180	-	80 70	-	BT 80 Fl 25	-	40	-	-	-	-	5	20	15	-	4)		
3	Bo.	♂	33	"	1500	V-1959	1200	2800	-	20	80	-	-	30	100	-	-	150	-	100	60	-	360	-	240 280	160 200	-	20	40	BT 130 Fl 40	-	-	40	-	-	0	20	20	-				
4	Scho.	♂	34	"	1250	VIII-1959	960 800 800	2240 2560 2560	-	25 20	80 100	15 10	-	20 30	90 160	-	-	-	-	90	60	-	200 160	-	120 100	100 120 140	-	5	20 10	BT 40-60 Fl 20-50	5	-	20	-	-	40	20	10	-	5)			
5	Fij.	♂	34	"	1400	VIII-1959	800	2200	-	40 30	55 60	10 15	-	25 35	40 50	-	-	-	-	60 80	50 80	-	200 180	-	200 180	140 120	-	30 20	5 20	BT 50 Fl 10	10	10	5	-	-	-	-	-	-				
6	V.	♂	35	"	1500	I-1960	640	2560	440	40	70	5	-	20	50	-	-	40	-	120	80	-	160	-	360	160	-	-	80	BT 80-120 Fl 10-15	-	-	20	-	-	80	10	-	-				
7	W.-P.	♀	69	Tuberculose Tuberculosis	540	VIII-1959	480 480	1280 960	-	20 20	70 70	5	-	25 25	5	-	-	10	-	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5)			
8	S.-D.	♀	30	Observatie Observation	1480	IV-1960	640	960	140	10	55	15	-	10	-	-	-	60 100	-	80 100	20 20	20	120 130	20	160	40	-	10	-	BT 40 Fl 20	20	-	10	-	-	5	5	40	-				
9	S.	♀	13	"	820	IVI-1960	800	2560	400	20	90	-	-	-	10	-	-	20	-	100	40	-	150	-	130	240	-	-	-	BT 80 Fl 20	5	5	40	-	-	-	20	-	-				
10	W.-W.	♀	29	"	1720	VI-1960	1200	2000	80	40	90	40	-	30	15	-	-	140	-	140	100	10	240	160	80	160	-	120 20	10 20	BT 70-60 Fl 30-50	60 60	-	-	-	-	-	-	20 40	20	-			
11	K.	♂	52	Art.circ. stoornis Vascular disease	1550	IX-1959	1000	3850	-	15	80 70	20 10	-	30 20	70 40	-	-	20 10	-	90 80 80	50 40 60	-	135 110	-	120 90	220 220	-	10	15	70	-	20	30	-	-	40 30	10	40	-				
12	G.	♀	23	Haemorrh. diathese Hemorrhagic disease	1240	IX-1959	640 800	2560 2240	-	?	140 120	-	-	20 15	25 20	-	-	-	80	170	65	50	540 600	-	480 540	320	-	20	5	BT 120-170 Fl 80-80	5 10	-	60	-	-	-	40	50	-				
13	D.	♂	16	Cirrhosis hepatis	750	II-1960	640	640	-	240	440	-	-	20	15	-	-	-	120	400	125	40	80	-	80	120	-	10	10	240	40	-	80	40	-	-	160	-	-				
14	W.	"♀"	18	Pseudo- hermaphr. Male pseudo- herma phroditism	1920	IV-1960	960 800	3840 4480	450	30	80	35	-	-	240	-	-	80	-	160	120	-	160	-	100	240	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	10	-	-				
14 ^a	"	"♀"	18	"	1300	X-1960	1280	3200	-	-	80	-	-	-	20	-	-	400	-	140	40	-	160	240	240	140	-	-	-	5	-	-	30	-	-	-	10	20	-				
15	Baby S.	♂	3m	Observatie Observation	230	I-1960	5	32	-	2	12	-	-	5	-	-	-	-	-	6	1	3	3	-	5	6	-	-	-	7	-	0,5	-	4	-	-	3	-	-				
16	Baby H.	♂	2w	"	175	III-1960	2	160?	-	2	15	-	2,5	-	-	-	-	-	1	12 12	1 2,5	7	7	-	-	16	-	-	1,5	16	-	-	-	4	-	0,5	2	6	-				
17	Baby N.	♂	2w	5w.praema- tuur geb. 5w. praeniat- ure bom	115	III-1960	3	28	-	1,5	7	-	-	1	-	-	-	-	1	16	1,5	6	35	-	1	2,5	-	-	0,5	16	-	-	0,5	2,5	-	-	2	16	-				

OVERZICHTSTABEL-SYNOPSIS OF DATA							STADIUM I - PHASE I														STADIUM II - PHASE II												STADIUM III - PHASE III							Opm. Remarks	
Nº Case	Naam Name	G S	L A	Diagnose Diagnosis	Diurese Diuresis (ml)	Datum Date	Fractie I Fraction I			Fractie II Fraction II		Fractie III Fraction III						Fractie IV Fraction IV				Fractie I Fraction I			Fractie II Fraction II		Fractie III Fraction III			Fractie IV Fraction IV				Fractie I Fraction I		Fractie II Fraction II		Fractie III Fraction III			
							H4F	H4E	"allo-H4F"	"U"	F	X1	Xa	X2	X3	Xb	Xc	X4	Ald.	E	H4S	Y1	H4B	Ya	"allo-H4B"	H4A	S	Y2	Y3	B	Y4	Y5	Y6	Za	Zb	Z1	A	Z2	DOC	1)	
18	v.d.L.	♀	65	M.Addison	600	VI-1959	100	375	-	5	20 25	-	-	10 15	-	-	-	5	-	15	130	-	60 40	-	30 20	30 30	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	sp	-	-	
19	Ba.	♂	33	M.Addison (tuberc.)	2500	XII-1959	60	320	-	0	5	-	-	35 40	25 40	-	-	100	-	25 20	100 110	20	40	-	30	40	-	-	50	0	-	-	20	-	-	10	0	-	-		
20	L.	♂	32	"	860	VI-1960	480 640	1280 1280	100	10	30	-	-	-	35	-	-	160 200	-	30 30	200 200	-	50	-	20	30 30	-	-	-	BT 30 Fl 15	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	
20 ^a	"	♂	32	"	1990	VII-1960	640 800	1280 1280	200	10	30	-	-	-	40 50	-	-	200	200	60	400	-	50	-	50	60	-	-	40	BT 60 Fl 10	20	-	10	-	-	45	0	-	-	6)	
21	Z.-U.	♀	39	Panhypopit. (postop.)	500	III-1960	120	50	-	0	5	-	-	10	-	-	-	25	10	10	20	30	-	25	10	-	-	30	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-			
22	Fo.	♂	75	Panhypopit. (chromoph. adenoma)	700	II-1960	90	225	-	2	4	-	-	4	-	-	-	2	8 8	28 24	16	24	-	28	24	-	-	2	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-			
23	R.	♂	60	Panhypopit. (post encephal.)	900	IV-1960	320	280	-	5	30	-	-	-	20	-	-	30 50	2	25 25	100	-	20	-	5	10	-	5	-	sp	-	-	-	-	-	-	0	-	-		
24	W.-B.	♀	75	Panhypopit.?	750	II-1960	240	640	-	10	35 30	-	-	10	5	-	-	5	-	40	30	-	70	70	40	20	-	-	5	10	5	-	50	-	-	-	sp	-	-		
25	O.	♀	40	Cushing's syndr. (hyperpl.)	1450	VIII-1959	2250	6400	-	40 40	120 150	5	-	30 30	30 30	-	35	60 60	-	180 200	80 80	-	240	-	200	180 140	-	50	20	80 100	-	-	200	-	-	-	60	45	-		
26	J.-A.	♀	57	Cushing's syndr. (carcinoma)	800	VI-1959	4200	9000	-	100	900	-	30	-	80	-	-	200	-	600	1200	-	150	?	(1200)	200 160	-	650	30	BT 20 Fl sp	20 Fl+	-	100	-	-	-	0	180	-	7)	
26 ^a	J.-A.	♀	57	"	400	II-1960	3800	9000	-	-	3800	-	280	-	160	120	120	200	-	960	1600	240	(1600)	720	(1280)	160	100	-	80	BT 80 Fl sp	BT 80 Fl 240	-	320	-	-	-	1600	-	8)		
27	M.	♀	18	"	1200	VIII-1960	6400	5120	200	160	1600	-	100	10	10	-	-	80 80	-	480 480	2560	300	320	640	?	80	80	1280	-	40	40	20	240 200	-	-	-	-	320	-	9)	
28	v.d.H.	♂	39	Cushing's syndr.?	800	XI-1959	800 960	3840 3840	-	20 30	140 140	5	-	30 40	45 60	-	-	30 40	-	150 180	30 40	-	150 160	-	200	100 120	-	50 50	5	50 50	20	20 40	100 160	-	-	5	30	80	-		
29	R.-R.	♀	51	Cushing's syndr. (postop.)	1900	I-1960	960	2560	-	10 30	80 80	-	-	25 25	5	-	-	20 20	-	120 160	60 40	-	360	-	280	220	-	10	60	BT 60 Fl 20	10	10	30	-	-	-	5	60	-		
30	M.-F.	♀	33	Adrenogen. syndr. (hyperpl.)	1000	XI-1959	400	1400	-	25	40	60	-	20	35	-	-	5	-	100	70	60	60	-	40	50	-	20	30	15	10	30	10	-	-	5	sp	5	-		
31	Sche.	♀	31	"	1760	I-1960	480	1800	-	30	55	50	-	20	40	-	-	40	-	70	60	20	60	?	(400)	40	-	160	50	BT 40 Fl 10	-	50	-	-	-	60	5	100	-	10)	
32	V.T.	♀ +	8	Adrenogen. syndr. carc.)	2910	IX-1960	1280	2560	<160	-	320	20	-	-	20	-	-	-	-	440	1280	50	±40		(560)	20	20	200	20	0	-	-	40	-	-	-	0	1000	-	10)	

OVERZICHTSTABEL-SYNOPSIS OF DATA

STADIUM I - PHASE I

STADIUM II - PHASE II

STADIUM III - PHASE III

OVERZICHTSTABEL-SYNOPSIS OF DATA							STADIUM I - PHASE I														STADIUM II - PHASE II														STADIUM III - PHASE III								Opm. Remarks
No Case	Naam Name	G S	L A	Diagnose Diagnosis	Diurese Diuresis (ml)	Datum Date	Fractie I Fraction I			Fractie II Fraction II		Fractie III Fraction III						Fractie IV Fraction IV				Fractie I Fraction I			Fractie II Fraction II		Fractie III Fraction III			Fractie IV Fraction IV				Fractie I Fraction I		Fractie II Fraction II		Fractie III Fraction III					
							H4F	H4E	"allo-H4F"	"U"	F	X1	Xa	X2	X3	Xb	Xc	X4	Ald.	E	H4S	Y1	H4B	Ya	"allo-H4B"	H4A	S	Y2	Y3	B	Y4	Y5	Y6	Za	Zb	Z1	A	Z2	DOC				
33	E. v.v.d.L.	♀	58	Conn's syndr. (adenoma)	1800	XI-1959	200	640	-	20	25	-	-	10	25	-	-	-	20	25 30 30	45 50 55	40 40	80	-	80 80	120	-	-	5	10	-	-	20	-	-	20	0	-	-				
34	M.-U.	♀	45	Conn's syndr. ? (hyperpl.)	2340	III-1960	400	600	100	20	70	5	-	10	20	-	-	-	40	80	40	-	150	40	160	100	-	10	40	30	120	-	30	-	-	50	5	40	-				
35	B.-B.	♀	49	"	1400	I-1960	400 400	1280 1600	-	5 10	40 40	-	-	30	10	-	-	120	-	70 80	40 40	-	280	-	60	240	-	20	40	BT 40 FI 10	10	-	40	-	-	10	0	20	--				
36	S.-N.	♀	49	"	2100	IX-1959	400 480	960 960	-	10 20	50 50	-	-	40	20	-	-	30 40 20	-	60 70 60	120 80 100	-	160	60	140	120	-	100	-	20	40	5	20	-	-	-	5	-	-				
37	v.H.-E.	♀	63	"	780	V-1959	±500	±1200	-	10 30	70 70	-	-	20	-	-	-	±150	-	±100	±100	20 20 20	160 240 200	35	-	80 85	-	5	5	40 20 40	40	50	-	-	-	-	10	5	-				
38	L.-D.	♀	40	Hypertensie Hypertension	1520	IV-1960	800 800	1280 1600	240	10	45	-	-	-	5	-	-	-	-	90	20	20	90	--	100	80	-	10	40	BT 40 FI 10	-	-	-	-	-	10	0	-	-				
39	Fa.	♂	21	Conn's syndr. (postop.)	1600	VIII-1959	480 640	1920 2240	-	20 30	90 90	-	25	25	100	-	-	200 200	-	150 120	100 85	160	160	--	90	200	-	20	100	20	-	-	-	-	-	30	0	40	-				
8a	S.-D.	♀	30	na 1 dag ACTH after 1 day ACTH	900	IV-1960	3200 3840	1920 2560	960	-	1280	-	-	-	-	-	-	50	-	280	200	40	1600	-	3200	480	-	-	-	240	--	-	-	60	60	-	160	240	-				
8b	"	♀	30	na 2 dagen ACTH after 2 days ACTH	1080	IV-1960	7680	5120	2560	-	3200	-	100	-	-	-	-	80	-	520	800	60	1920 2240	320	3200	960	-	-	160	320	-	-	160	40	-	-	120	-	-				
28a	v.d.H.	♂	39	na 1 dag ACTH after 1 day ACTH	1700	XII-1959	9000	9000	-	-	1900	-	100	-	100	15	70	150	-	500	500	-	2400 2240	-	1920	800	320 320 320	-	-	240	5 5 40	20 40	240	-	-	-	120	180	-				
28a	"	♂	39	"	1700	XII-1959	9000	9000	-	-	1900	-	80	-	90	-	30	50	-	500	500	-	2240	-	1920	800 800	40	-	240	240	5	50	20	50	-	-	120	180	-	3)			
28b	"	♂	39	na 2 dagen ACTH after 2 days ACTH	1400	XII-1959	9000	9000	-	-	1920	-	-	35	70	20	55	-	-	400	800	-	2240 1600 1920	-	1920	1280 1280 960	-	-	160 120	200 240	5	40	800	20	-	-	160	400	-				
13a	D.	♂	16	na 1 dag ACTH after 1 day ACTH	660	III-1960	3200	960	-	320	1920	-	15	-	10	15	-	-	320	640	960	640	1600	-	1120	800	80	-	-	1280	-	-	640	200	80	-	1920	320	60	11)			
34a	M.-U.	♀	45	na 1 dag ACTH after 1 day ACTH	2720	IV-1960	5120 4480	2560 1920	-	80	1920 1600	-	-	-	60	-	-	-	80	440	800	80	2560	-	960	640	-	-	40	320	80	-	40	80	280	-	200	200	-				
23a	R.	♂	60	na 1 dag ACTH after 1 day ACTH	2160	VI-1960	800	560	40	20	100	-	-	-	30	-	-	5	-	80	300	-	90	-	35	25	-	-	-	30	-	-	10	-	-	-	5	-	-				
23b	"	"	"	na 2 dagen ACTH after 2 days ACTH	1900	VI-1960	1600	960	160	20	120	-	-	-	40	-	-	-	-	120	800	-	200	-	(1120) 50	100	20	-	10	25	-	-	10	-	-	-	10	-	-	12)			
20b	L.	♂	32	na 1 dag ACTH after 1 day ACTH	1460	VI-1960	400 320	1440 1600	150	15	30	-	-	-	50 40	-	-	240	-	25	240	-	60	5	40	60	-	-	-	10	-	-	-	-	-	80	0	100	-				
20c	"	"	"	na 2 dagen ACTH after 2 days ACTH	1930	VI-1960	240	1120	100	10	30	-	-	-	35	-	-	320	-	40	280	-	50	30	40	40	-	-	-	10	-	-	-	-	-	20	0	50	-				
40	E.	♀	45	na 1 dag SU-4885 after 1 day SU-4885	680	V-1960	640	1240	120	10	30	-	-	-	30	-	-	-	-	±20	10000	-	160 (480)	-	120	160	120	-	-	BT 100 FI 30	-	-	5	-	-	-	0	(480)	280	13)			
40a	"	"	"	na 2 dagen SU-4885 after 2 days SU-4885	580	V-1960	80	60	-	-	sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14600	-	- (960)	-	-	40	240	-	-	sp	-	-	40	-	-	-	0	(2500)	400	14)			
40b	"	"	"	2 dagen later 2 days later	600	V-1960	1040*	2240	400	20	80	-	-	-	5	-	-	240	-	100	580	60	140	-	200	160	-	-	20	60	-	-	-	-	-	-	40	10	--				
23c	R.	♂	60	na 1 dag SU-4885 after 1 day	1750	V-1960	160	240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	720	-	±10	-	20	30	40	-	5	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-				

OVERZICHTSTABEL-SYNOPSIS OF DATA							STADIUM I - PHASE I													STADIUM II - PHASE II										STADIUM III - PHASE III							Opm. Remarks				
No Case	Naam Name	G S	L A	Diagnose Diagnosis	Diurese Diuresis (ml)	Datum Date	Fractie I Fraction I			Fractie II Fraction II		Fractie III Fraction III					Fractie IV Fraction IV					Fractie I Fraction I		Fractie II Fraction II		Fractie III Fraction III		Fractie IV Fraction IV			Fractie I Fraction I		Fractie II Fraction II		Fractie III Fraction III						
	.						H ₄ F	H ₄ E	"allo- H ₄ F"	"U"	F	X ₁	X _a	X ₂	X ₃	X _b	X _c	X ₄	Ald.	E	H ₄ S	Y ₁	H ₄ B	Y _a	"allo- H ₄ B"	H ₄ A	S	Y ₂	Y ₃	B	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Z _a	Z _b	Z ₁		A	Z ₂	DOC	
23 ^d	"	"	"	na 2 dagen SU-4558 after 2 days SU-4885	1750	V-1960	30	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	-	2080	-	-	-	-	-	80	-	5	0	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-